

Université du Québec à Trois-Rivières

Mémoire présenté à
Université du Québec à Trois-Rivières

Comme exigence partielle à l'obtention de la maîtrise
en Biophysique

Par
Martin Williams, B.Sc.

Design, purification et caractérisation du mutant à
pont disulfure (MB-1LH) de la protéine *de novo*
MB-1

Novembre 2000

1994

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma famille et ma conjointe Nada Sarkis pour leurs mots encourageants, leur soutien et leur amour pendant la durée de mes études. Ces personnes ont été primordiales à favoriser un environnement permettant l'apprentissage nécessaire à la réussite de mes études.

J'aimerais remercier mes collègues de travail: Alain, Mylène, Jennifer, Pierre-Luc, François-Olivier, Jean-Guy, Marc-André et Nicholas, qui m'ont donné la chance d'apprendre énormément et qui ont réussi à garder un environnement positif dans le laboratoire pendant mes études à la maîtrise.

Je voudrais remercier Mme Diane Désy de l'audiovisuel pour son aide à la préparation de mes diapositives pour mon séminaire de maîtrise.

Je désire enfin remercier mon superviseur de maîtrise, Marc Beauregard, Ph.D., pour m'avoir offert la possibilité de faire partie de son équipe très dynamique et de travailler sur un projet très intéressant. Merci Marc pour ta confiance en moi et pour m'avoir guidé dans mon projet de recherche.

Pendant ma maîtrise, la recherche a été subventionnée par les Producteurs laitiers du Canada et par le CRSNG. De plus, j'ai eu la chance d'obtenir une bourse d'études « Intervention spéciale » de l'UQTR. J'aimerais remercier ces organisations pour leurs contributions à mon éducation.

Resumé

MB-1 est une protéine *de novo* ayant un pourcentage élevé (57%) en certains acides aminés essentiels qui sont limitants à une production optimale de lait et de protéines de lait, particulièrement chez les vaches en haute lactation. Cependant, des résultats obtenus pour la protéine MB-1 démontrent qu'elle n'est présentement pas suffisamment stable, au niveau conformationnel et protéolytique, pour suppléer à la déficience en ces acides aminés essentiels en nutrition animale. Des stratégies pour tenter d'améliorer la stabilité de MB-1 furent élaborées. Dans ce mémoire, le design, la création, la purification et la caractérisation d'une protéine dérivée de MB-1 (MB-1LH) sont discutés. La seule différence entre MB-1 et MB-1LH est la présence d'un pont disulfure, entre l'hélice 1 et l'hélice 4 du carré d'hélices, dans la protéine mutée. En caractérisant le nouveau mutant, on peut voir que les mutations sont très déstabilisantes lorsque le pont disulfure est brisé. Cependant, lorsque le pont est intact, il réussit à compenser la déstabilisation due aux mutations et réussit même à augmenter la stabilité conformationnelle et protéolytique de MB-1LH. L'impact de ces résultats au niveau de l'application de la protéine MB-1 et ses dérivés comme supplément en nutrition animale, ainsi qu'au niveau du contrôle de la topologie en design des protéines, est discuté.

Tables des Matières

Remerciements	i
Résumé	ii
Tables des matières	iii
Liste des schémas	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii

Chapitre 1: Introduction

1.1. Les protéines	2
1.1.1. Structures des protéines	2
1.2. Sources d'acides aminés	4
1.2.1. Digestion et absorption des protéines de la diète	6
1.2.2. Demandes en acides aminés essentiels (AAEs)	7
1.3. Trois approches de supplémentation des AAEs	8
1.4. Design <i>de novo</i> de MB-1	10
1.4.1. Stabilisation conformationnelle et protéolytique de MB-1	15
1.5. Design du mutant de MB-1: MB-1LH	16
1.6. Les buts de mon mémoire	22
1.7. Introduction au papier soumis à "Protein Engineering"	22

Chapitre 2: Article scientifique soumis à la revue “Protein Engineering”

2.1.	Abstract	26
2.2.	Introduction	27
2.3.	Materials and Methods	31
2.3.1.	Preparation of the new S-S bridged MB-1 mutant	31
2.3.2.	Protein expression and purification	31
2.3.3.	Protein quantification and electrophoresis	33
2.3.4.	Quantification of cysteine residues and assessment of bridge formation	33
2.3.5.	Conformational investigation by circular dichroism (CD)	33
2.3.6.	Thermal denaturation	34
2.3.7.	ANSA fluorescence enhancement	35
2.3.8.	Fluorescence quenching measurements	35
2.3.9.	Proteolytic degradation measurements	35
2.4.	Results	36
2.4.1.	Design strategy	36
2.4.2.	Characterisation of MB-1LH structures	37
2.4.3.	Effect of the bridge on MB-1LH stability	38
2.5.	Discussion	40
2.6.	Acknowledgements	43
2.7.	References	44
2.8.	Figure legends	47

Chapitre 3: Conclusion

3.1.	Pourquoi stabiliser MB-1?	56
3.2.	Comment stabiliser MB-1?	57
3.3.	Caractérisation de MB-1LH	57
3.4.	Méthodes d'expression envisagées	60
3.5.	Suggestions pour améliorer la stabilité conformationnelle et protéolytique de MB-1 et ses dérivés	61
3.6.	Références (Chapitres 1 et 3)	63

Liste des schémas

1.1	Structure de base d'un acide aminé et de la liaison peptidique	3
1.2	Les trois niveaux d'organisation impliqués dans le repliement des protéines	5
1.3	Séquence d'acides aminés de MB-1	11
1.4	La structure tertiaire du carré d'hélices envisagée pour MB-1	12
1.5	Séquence du gène MB-1 et de la protéine	14
1.6	Dépliage d'une protéine avec et sans ponts disulfures	17
1.7	Structure tertiaire d'un carré d'hélices	18
1.8	Séquence du gène muté MB-1LH et de la protéine	20
1.9	Connectivité main gauche vs connectivité main droite	21

Liste des figures

Figure 2.1	Design of MB-1LH	49
Figure 2.2	Circular dichroism spectra of MB-1LH with its bridge open (+DTT) ... or closed (-DTT)	50
Figure 2.3	Quenching of MB-1LH tyrosine 62 fluorescence induced by citrate	51
Figure 2.4	Enhancement of ANSA fluorescence by MB-1LH	52
Figure 2.5	Thermal denaturation curve for MB-1LH	53
Figure 2.6	Degradation of MB-1 and mutant by Pronase E	54

Liste des abréviations

Aas	acides aminés
AAEs	acides aminés essentiels
MB-1	Milk Bundle-1
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ANSA	acide 8-anilino-1-naphthalènesulfonique
MB-1LH	Milk Bundle-1 (Left handed)
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
OD	densité optique
LB	Luria Bertani
IPTG	isopropylthio- β -D-galactoside
PMSF	phénylméthylsulfonylfluoride
EDTA	acide éthylène diamine-tetraacétique
EGTA	acide éthylèneglycol-bis(β -aminoéthyléther)- N'N'N'N'- tetraacétique
MBP	protéine liant le maltose
MWCO	limite de taille moléculaire retenue
DEAE	diethylaminoethyl
TE	tris-EDTA

BCA	acide bicinchoninique
BSA	albumine sérique bovine
SDS	dodécyl sulfate de sodium
DTT	dithiothreitol
MRW	poids moyen de résidue
CD	dicroïsme circulaire
CDsstr	structure secondaire par dichroïsme circulaire

Chapitre 1

Introduction

1.1. Les protéines

Les protéines sont probablement les macromolécules biologiques les plus importantes pour assurer un fonctionnement parfait de tous les systèmes complexes de la vie. Les fonctions qu'adoptent les protéines sont nombreuses, comme par exemple, les protéines sont nécessaires pour maintenir la structure et le mouvement de chaque organisme vivant en plus d'être responsables de la catalyse de toutes les réactions chimiques nécessaires à la survie. Ces exemples démontrent seulement une minime portion des rôles que les protéines jouent pour le bon fonctionnement d'un corps vivant. Cependant, malgré les nombreuses fonctions que les protéines peuvent adopter, on remarque que chacune de ces protéines est composée d'un bagage restreint de plus petites molécules nommées acides aminés (aas).

1.1.1. Structures des protéines

Les acides aminés sont des molécules composées de 4 groupements chimiques différents tous attachés à un carbone chiral (schéma 1.1A). Afin de produire les protéines, la nature utilise seulement 20 acides aminés spécifiques, chacun d'eux pouvant se distinguer par sa chaîne latérale (R) connectée au carbone chiral. La liaison entre les acides aminés par un lien peptidique (schéma 1.1B) mène à la formation d'un polymère qui constitue la structure primaire d'une protéine (schéma 1.2A). Tout dépendant de la polarité et de la distribution des différentes chaînes latérales, les protéines peuvent adopter des arrangements spatiaux spécifiques permettant d'organiser la conformation du squelette peptidique par rapport à son environnement. Ces arrangements spécifiques et locaux constituent les structures secondaires des protéines. Chez les protéines, il y a 2

types d'organisations spatiales locales qui sont très répandus : 1) les hélices alpha, (schéma 1.2B) et 2) les feuillets bêta (schéma 1.2B). Ces structures secondaires sont caractérisées par une panoplie de liens hydrogènes et par des angles dièdres répétitifs qui impliquent le lien peptidique liant chacun des acides aminés. L'empaquetage des structures secondaires afin de minimiser l'exposition des surfaces hydrophobes et l'arrangement final de toutes les structures secondaires d'une protéine constituent sa structure tertiaire (schéma 1.2C). C'est à ce niveau que la fonction de chacune des protéines peut être déterminée. Cependant, il faut se rappeler que c'est principalement la structure primaire de la protéine qui va dicter le repliement menant à la conformation finale et donc la fonction de chacune des protéines.

1.2. Sources d'acides aminés

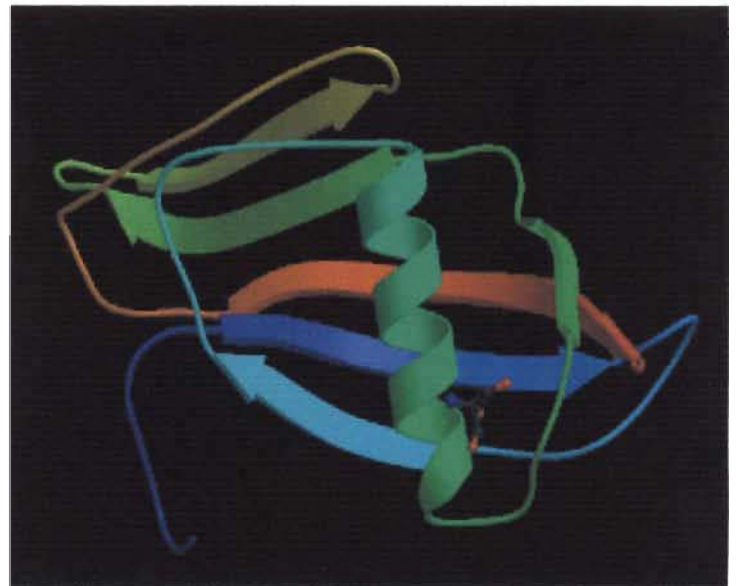
Les acides aminés nécessaires pour la majorité des animaux peuvent être obtenus soit de la diète ou soit par le métabolisme interne de chaque animal. Les protéines provenant de la diète sont normalement dégradées en acides aminés au niveau de l'estomac et de l'intestin. Ces acides aminés sont ensuite absorbés par l'intestin et peuvent donc être utilisés pour répondre aux différentes fonctions nécessaires de l'animal. Cependant, si l'animal n'a pas un contenu en acides aminés acceptable pour assurer un bon fonctionnement, il peut, à l'aide de son métabolisme interne, synthétiser certains acides aminés pour régler cette déficience dans la diète. Par contre, certains acides aminés, même s'ils sont déficients dans la diète, ne peuvent pas être synthétisés



A. Structure primaire

Hélice- α

Feuillet bêta



B. Structures secondaires

C. Structure tertiaire

Schéma 1.2 : Les trois niveaux d'organisations impliqués dans le repliement des protéines. A) **Structure primaire** : Séquence des acides aminés formant le squelette de chacune des protéines. B) **Structure secondaire** : Arrangements tridimensionnels locaux caractérisés par une panoplie de liens hydrogènes et d'angles dièdres donnant lieu à la formation d'hélices α et de feuillets β . C) **Structure tertiaire** : Arrangement final de toutes les structures secondaires pour former une protéine globulaire avec un noyau hydrophobe compact et stable.

par le métabolisme interne de l'animal à cause d'un manque de certaines voies métaboliques. Ces acides aminés sont classifiés comme étant des acides aminés essentiels (AAEs) alors que ceux que les animaux peuvent synthétiser naturellement sont appelés des acides aminés non-essentiels. L'histidine (H), isoleucine (I), lysine (K), leucine (L), méthionine (M), thréonine (T), phénylalanine (F), tryptophan (W) et la valine (V) sont considérés comme étant des AAEs et doivent donc être pris en quantités suffisantes pour assurer le maintien et la croissance de chaque animal (Purser, 1970). Cependant, chez les ruminants en lactation élevée, certains de ces AAEs doivent être pris en quantité plus grande pour assurer leur maintien et leur croissance, et aussi pour optimiser leur lactogénèse (production de lait).

1.2.1. Digestion et absorption des protéines de la diète

Chez les ruminants, comme les vaches laitières, la quantité et la qualité des protéines absorbées dans la diète vont être importantes pour assurer une production optimale de lait et des protéines de lait. Cependant, la quantité en acides aminés essentiels accessibles à la vache laitière va dépendre en grande partie de la dégradation protéolytique dans le rumen. Le rumen est le compartiment responsable de la digestion de la majorité des protéines, cela grâce à la présence de nombreuses bactéries. La majorité (60 à 70%) des protéines solubles ingérées dans la diète vont être dégradées à l'aide de protéases membranaires et de peptidases provenant des microbes du rumen (Hutjens *et al*, 1996; Church, 1988). Une fois sous formes de peptides ou d'acides aminés, les microbes vont les absorber et les utiliser pour répondre à plusieurs besoins nécessaires à leur survie. En effet, une bonne partie des acides aminés absorbés vont être utilisée pour

synthétiser des protéines microbiennes. Ces protéines microbiennes, en plus des protéines qui ont contourné la dégradation ruminale, vont transiter vers l'intestin. Au niveau de l'intestin, où l'acidité est beaucoup plus grande ($\text{pH} = 2$), les protéines vont être dénaturées par l'acidité, dégradées par les enzymes intestinales et les acides aminés libérés vont être absorbés par les parois de l'intestin. Ce sont donc ces acides aminés qui vont être accessibles à la production de protéines pour le maintien, la croissance, mais aussi pour une production laitière optimale.

1.2.2. Demande en acides aminés essentiels (AAEs)

Environ 60% des acides aminés du corps animal est constitué d'acides aminés essentiels (Miller, 1979), donc il est nécessaire que l'animal réponde à ce besoin par la qualité des protéines de la diète (contournant la dégradation ruminale) et par la qualité des protéines microbiennes. Étant donné que la majeure partie des protéines de la diète (60 à 70%) est absorbée par les microbes, cela nous indique que la majeure partie des acides aminés essentiels doit donc provenir des protéines microbiennes. Chez beaucoup de ruminants, le contenu en acides aminés essentiels des protéines microbiennes et des protéines contournant la dégradation ruminale est satisfaisant pour assurer un fonctionnement normal. Cependant chez les ruminants domestiques en production élevée, la quantité d'acides aminés essentiels provenant de la synthèse microbienne est limitante (Church, 1988). Ce qui se passe est que souvent, la dégradation microbienne des protéines de la diète va être plus grande que la synthèse de protéines par les microbes, ce qui résulte en une diminution de la quantité et de la qualité des acides aminés essentiels accessibles à ces animaux. Les acides aminés les plus déficients sont la méthionine (M),

et la lysine (K) d'une part et la déficience en thréonine (T) et en leucine (L) d'autre part (en moins grande déficience) (Orskov *et al*, 1987; Chalupa, 1975; Stern *et al*, 1985; Ashes *et al*, 1995).

1.3. Trois approches de supplémentation des AAEs

Il existe présentement 3 approches majeures ayant la possibilité de fournir une quantité optimale d'AAEs. La première approche consiste à donner des suppléments d'acides aminés essentiels (lysine et méthionine principalement) protégés par cuisson, par traitement chimique ou par encapsulation (Chalupa, 1975; Stern *et al*, 1985; Ashes *et al*, 1995; McNiven *et al*, 1994). Une des méthodes la plus utilisée et des plus intéressante est l'encapsulation des acides aminés. La capsule protégeant les AAEs est faite à partir d'un polymère qui est sensible au pH des différents compartiments digestifs de l'animal. C'est à dire que, au niveau du rumen où le pH est neutre (6-7), la capsule va rester intacte et les microbes du rumen ne pourront pas avoir accès aux acides aminés essentiels encapsulés. Cependant, une fois arrivée au niveau de l'abomasum, le pH va devenir très acide (2) et la capsule va se dissoudre pour libérer son contenu. Les acides aminés peuvent ensuite être absorbés et sont disponibles à l'animal. Il a été démontré que cette technique peut augmenter de façon significative la production de lait et de protéines du lait. Même si cette technique réussit à augmenter la production laitière, certains désavantages sont rencontrés avec cette méthode. Le désavantage majeur de cette approche est que les suppléments doivent être achetés, ce qui augmente énormément le coût de production pour les producteurs laitiers. Un deuxième désavantage est que cette technique d'encapsulation peut rendre la digestion de ces suppléments plus difficile, même au

niveau de l'abomasum, ce qui n'apporte pas les bénéfices attendus de ces suppléments (Tamminga, 1979; Tanner *et al*, 1994; Stern *et al*, 1985; Chalupa, 1975, Ashes *et al*, 1995).

La deuxième approche pouvant être utilisée est de compléter ces acides aminés essentiels sous forme d'une protéine naturellement stable dans ces conditions ruminales. Cependant pour que cette méthode fonctionne, il faut que le contenu en acides aminés de la protéine d'intérêt soit élevé en ces acides aminés essentiels. Jusqu'à présent aucune protéine n'est connue ayant un contenu élevé en ces AAEs limitants. Un deuxième côté de cette approche est de modifier le contenu en AAEs de la protéine d'intérêt par mutagenèse dirigée. Cependant, les mutations qu'il faudrait faire pour bien enrichir la protéine influencent énormément la stabilité de la protéine (Hoffman *et al*, 1988; Lawrence *et al*, 1990; Dyer *et al*, 1993; DeLumen *et al*, 1997). Cette déstabilisation rendrait la protéine facilement dégradable dans le rumen et son efficacité serait fortement diminuée.

La troisième approche et celle que notre équipe a décidé d'utiliser est la création d'une protéine *de novo*, c'est à dire la création d'une protéine d'une séquence synthétique à partir des principes et hypothèses connues sur le repliement des protéines (Beauregard *et al*, 1995; Jaynes *et al*, 1985). De cette façon, il devrait être possible de créer une protéine ayant un contenu élevé en AAEs tout en obtenant une protéine plus stable dans des conditions ruminales. Cela nous permettrait de créer une protéine pouvant être utilisée comme supplément nutritif en agriculture, mais aussi comme protéine d'étude pour les lois fondamentales sur le repliement des protéines.

1.4. Design *de novo* de MB-1

La protéine *de novo* qui a été créée par cette approche est la protéine MB-1 (Milk Bundle-1) (Beauregard *et al*, 1995). MB-1 est une protéine de 100 acides aminés ayant un poids moléculaire de 11.3kDa. Le contenu en AAEs (M, T, K et L) est de 57% (schéma 1.3), un pourcentage d'AAEs qui n'a pas encore été observé chez une protéine naturelle. Étant donné que 3 des 4 AAEs sont des bons formeurs d'hélices et que les hélices sont les structures secondaires les mieux connues en design (Bryson *et al*, 1995), la structure tertiaire envisagée pour MB-1 est un carré de 4 hélices (schéma 1.4A). Donc, en utilisant les principes fondamentaux connus et les hypothèses relatives au repliement des protéines (effets de la taille, volume, charge, hydrophobicité des acides aminés), Beauregard et ses collaborateurs ont été capables de dessiner une protéine ayant un contenu élevé en AAEs et ayant la possibilité d'avoir la conformation d'un carré d'hélices.

Sur le schéma 1.4A, on peut voir qu'un carré d'hélices est composé de 4 hélices. Chacune des hélices est connectée par des segments apériodiques (loops) qui permettent aux hélices de former le noyau hydrophobe de la protéine et ainsi cacher ses chaînes latérales hydrophobes. La formation du noyau hydrophobe est la force majeure dans le repliement d'une protéine globulaire soluble (Dill, 1990; Privalov, 1979). Donc il faut s'assurer d'avoir des résidus de bonne polarité aux bonnes positions de chacune des hélices pour espérer obtenir un noyau hydrophobe stable. Pour ce faire, les hélices de la protéine MB-1 ont été divisées en 7 positions récurrentes (une heptade) (schéma 1.4B). Dans l'heptade, on peut remarquer que les 7 positions de chacune des hélices sont récurrentes après deux tours (3.5 acides aminés par tour d'hélice). Les positions nommées

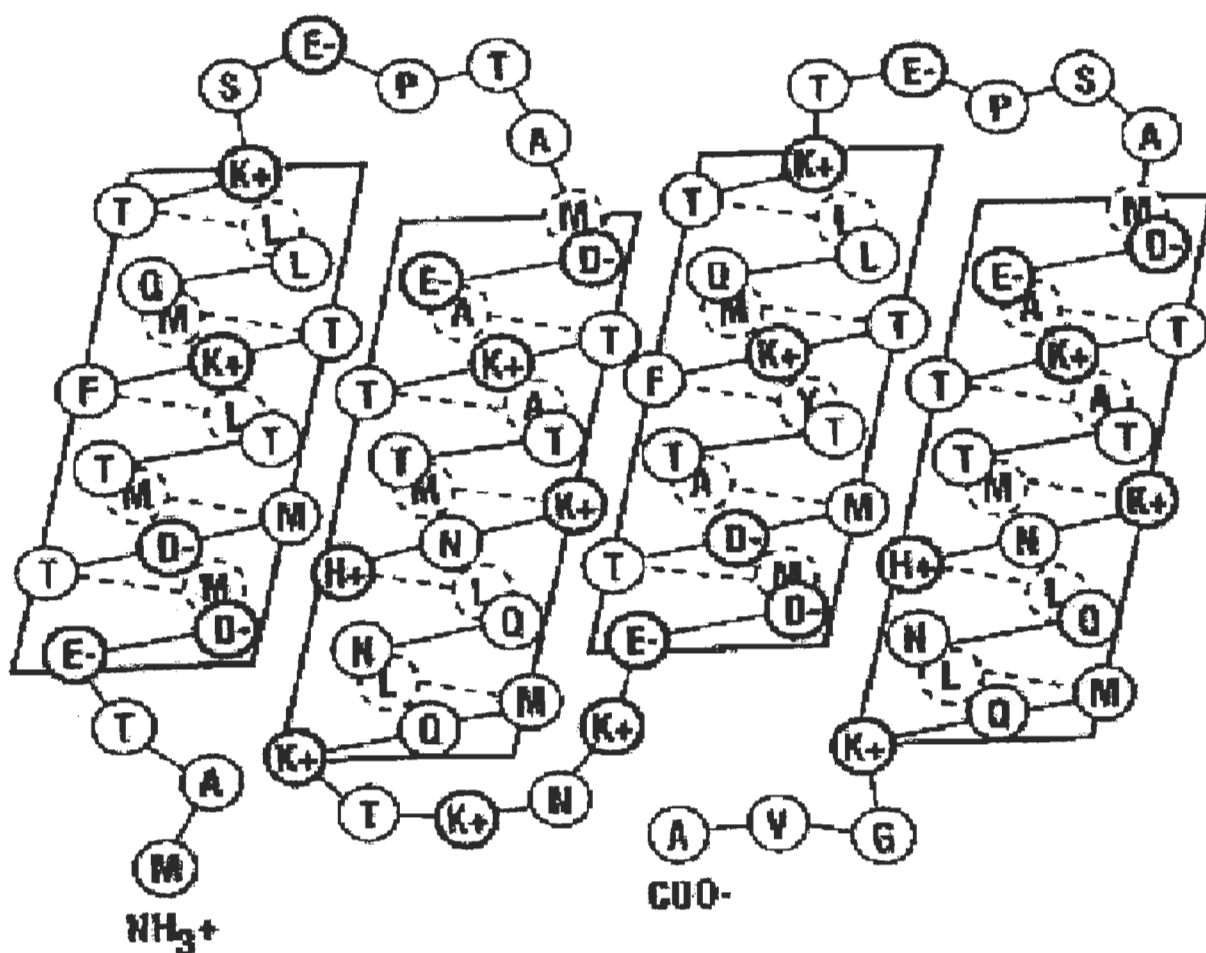


Schéma 1.3 : Séquence d'acides aminés de MB-1. Cette figure est une représentation schématique des 4 hélices de MB-1 aplaties contre un mur. Les acides aminés connectés par des lignes solides sont ceux exposés à la surface hydrophile, alors que ceux connectés par une ligne pointillée sont les acides aminés faisant partie du noyau hydrophobe. Cinquante-sept pourcent des 100 acides aminés sont des AAEs telles que la méthionine (M), la lysine (K), la leucine (L) et la thréonine (T).

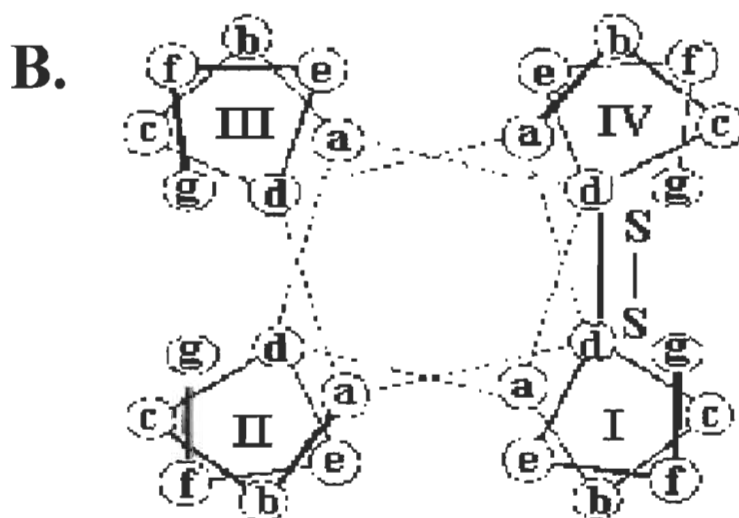
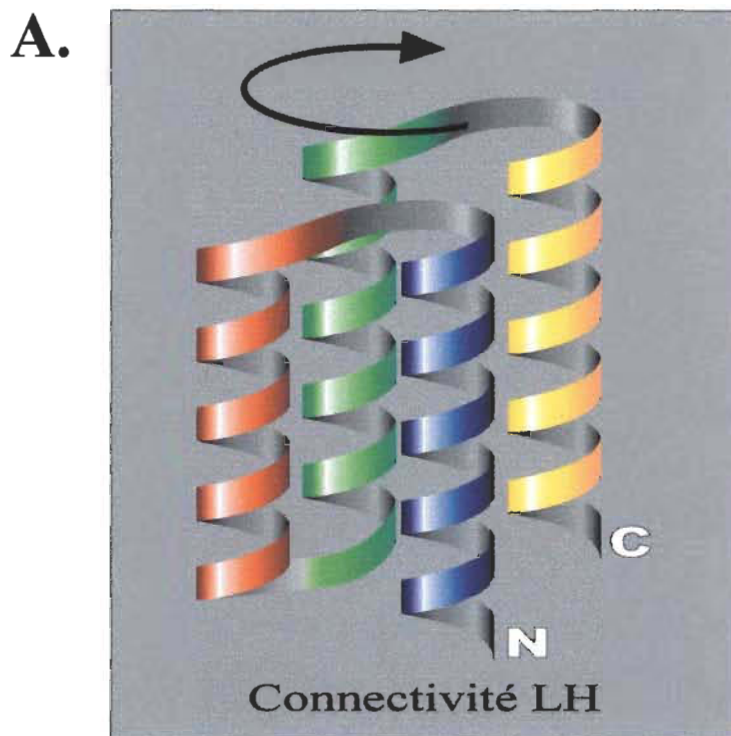


Schéma 1.4 : La structure tertiaire du carré d'hélices envisagée pour MB-1. A)

Voici un modèle à ruban représentant une vue du côté d'un carré d'hélices. Ici le carré d'hélices possède une connectivité gauche. (c'est-à-dire que si l'hélice 1 (bleu) est en avant et que le bout Nt va du bas vers le haut, la direction par laquelle la deuxième hélice tourne indique la connectivité). Si on tourne le carré d'hélices à 90° vers la surface de la page, on obtient une vue du dessus du carré d'hélice (**B**).

B) Voici une vue du dessus du carré d'hélices qui démontre chacune des hélices avec leurs 7 positions récurrentes (a-g). Les positions c, f et b sont les positions les plus exposées à l'eau. Les positions e et g sont des positions intermédiaires (participant un peu à la formation du noyau hydrophobe et les positions a et d sont les positions majeures formant presque la totalité du noyau hydrophobe de la protéine.

b, c et f sont des positions exposées à l'eau (ou hydrophiles), les positions g et e sont plus ou moins exposées à l'eau (participent plus ou moins à la formation du noyau hydrophobe) et les positions a et d sont les positions cachées qui forment la majeure partie du noyau hydrophobe (Cohen *et al*, 1990). En plus de 4 hélices, un carré d'hélices nécessite 3 segments apériodiques contenant de bons briseurs d'hélices telle que la proline et la glycine en plus de résidus polaires très hydrophiles. Dans notre cas, des résidus telles que la proline et quelques acides aminés polaires (lysine et acide aspartique) furent utilisés. En se basant sur l'hydrophobicité, la charge et le volume de chacun des acides aminés, en plus d'essayer d'incorporer le plus possible les 4 AAEs choisis, la séquence de la protéine MB-1 fut optimisée et encodée sur un gène (schéma 1.5). Une fois sous forme de gène, la protéine a été exprimée et purifiée de son hôte (*E.coli*) et une analyse du contenu en acides aminés a démontré que la protéine contient bel et bien 57% d'AAEs et qu'elle a un poids moléculaire de 11.3kDa, tel qu'attendu (Beauregard *et al*, 1995). De plus, des études de dichroïsme circulaire ont démontré que la protéine comprend environ 60% de structures secondaires hélicoidales (Beauregard *et al*, 1995).

Afin de déterminer si la Tyr 62 (introduite stratégiquement pour être dans le noyau hydrophobe) est bien présente dans le noyau, des études de quenching de fluorescence furent effectuées et ont indiqué que la Tyr62 est cachée dans le noyau hydrophobe de MB-1, telle que prévu (MacCallum *et al*, 1997). De plus, l'affinité pour l'acide 8-anilino-1 naphthalenesulfonique (ANSA) est basse, ce qui est indicatif d'un noyau hydrophobe bien compact (Hefford *et al*, 1999). Tous ces résultats permettent de supposer que la protéine MB-1 ressemble à un carré d'hélices et qu'elle contient

5'- ATG GCT ACG GAA GAC ATG ACC GAC ATG ATG
 M A T E D M T D M M

 ACC ACC CTG TTT AAA ACT ATG CAG CTG TTG
 T T L F K T M Q L L

 ACC AAG TCG GAA CCC ACG GCT ATG GAC GAG
 T K S E P T A M D E

 GCC ACT AAA ACG GCT ACT ACA ATG AAG AAT
 A T K T A T T M K N

 CAT CTT CAA AAC CTG ATG CAG AAG ACT AAG
 H L Q N L M Q K T K

 AAC AAA GAA GAC ATG ACG GAC ATG GCC ACT
 N K E D M T D M A T

 ACG TAC TTC AAA ACG ATG CAG TTG TTA ACG
 T Y F K T M Q L L T

 AAG ACC GAC CCC TCG GCC ATG GAC GAG GCC
 K T E P S A M D E A

 ACG AAG ACG GCT ACA ACC ATG AAA AAT CAT
 T K T A T T M K N H

 CTG CAG AAC TTG ATG CAA AAA GGC GTA GCT
 L Q N L M Q K G V A

 TAA-3'
 FIN

Schéma 1.5 : Séquence du gène MB-1 et de la protéine. Le gène est exprimé en codon (3 nucléotides) de l'ADN alors que la protéine est exprimée par son code à une lettre (par rapport à chacun des codons).

plusieurs caractéristiques similaires à une protéine naturelle. Cependant, même avec toutes ces bonnes caractéristiques, la protéine n'est pas assez stable pour résister suffisamment longtemps dans des conditions ruminales. Le T_m (température de fusion) évalué pour MB-1 est de 39°C, ce qui nous indique que dans le rumen (où la température est de 39°C), 50% de la protéine MB-1 serait dénaturé. En fait, la dégradation de MB-1 par les protéases microbiennes est très rapide (≈ 30 min), ce qui indique que la protéine n'est pas encore assez stable pour agir comme un supplément nutritif efficace (MacCallum *et al*, 1997).

1.4.1. Stabilisation conformationnelle et protéolytique de MB-1

Afin d'augmenter la stabilité conformationnelle d'une protéine, on peut essayer d'améliorer son noyau hydrophobe en le rendant plus compact ou on peut ajouter des spécificateurs de repliement pour renforcer une telle conformation ou pour en défavoriser une autre qu'on ne veut pas. Chez MB-1, on va ajouter des spécificateurs de repliement pour essayer de stabiliser la protéine. Les spécificateurs qui peuvent être utilisés sont : 1) des sites pouvant lier des métaux, 2) des ponts salins et 3) des ponts disulfures. Dans notre cas, ce sont les ponts disulfures qui ont été choisis. On a choisi les ponts disulfures pour cinq raisons : 1) seulement 2 mutations cystéines sont nécessaires, ce qui n'influence presque pas le contenu en AAEs, 2) le lien covalent d'un pont disulfure est très fort et est présent dans plusieurs protéines naturelles et 3) des ponts disulfures ont déjà été introduits dans d'autres protéines par mutagenèse dirigée (avec succès) (Zhou *et al*, 1993; Matsumura *et al*, 1989a; Matsumura *et al*, 1989b), 4) la capacité d'un pont disulfure à augmenter la stabilité conformationnelle d'une protéine est bien connue

(Wrede *et al*, 1994; Creighton, 1989) et 5) un pont disulfure est une structure connue pour augmenter la résistance à la dégradation protéolytique dans le rumen. (Hancock *et al*, 1994; McNabb *et al*, 1994; Spencer *et al*, 1988; Mahadevan *et al*, 1980). Un des effets d'un pont disulfure est qu'il va déstabiliser l'état dénaturé de la protéine en diminuant son entropie. L'entropie va être diminuée puisque le lien covalent du pont disulfure va diminuer la liberté des chaînes liées, ce qui va donc favoriser l'état natif de la protéine (Betz *et al*, 1993; Zhou *et al*, 1993) (schéma 1.6). L'introduction d'un pont disulfure peut donc nous apporter de la stabilité conformationnelle et de la stabilité contre la dégradation protéolytique. Ces deux éléments sont très intéressants puisqu'en augmentant la stabilité thermique (T_m) de MB-1 de quelques °C, cela pourrait augmenter significativement la résistance de MB-1 à la dégradation dans le rumen.

1.5. Design du mutant de MB-1 : MB-1 LH

Après avoir choisi le pont disulfure comme spécificateur de repliement, il fallait premièrement introduire des résidus cystéines dans la protéine puisqu'elle n'en contenait pas. La deuxième chose dont il fallait tenir compte est que les cystéines doivent être introduites assez proche l'une de l'autre dans la protéine en plus d'être dans une région qui donnerait à la protéine une stabilité conformationnelle optimale. Puisqu'on connaît que le pont disulfure augmente la stabilité conformationnelle en diminuant l'entropie de l'état dénaturé, le pont a été conçu pour se faire entre l'hélice 1 et l'hélice 4 du carré d'hélices (schéma 1.7). De cette façon, le degré de liberté de presque toute la protéine est limitée, ce qui défavorise encore plus l'état dénaturé de la protéine (Klink *et al*, 2000). Une autre raison est que chez MB-1, une fraction de la protéine purifiée est dégradée pour donner un produit de dégradation équivalent à 8.4 kDa. (Hefford et Beauregard non-

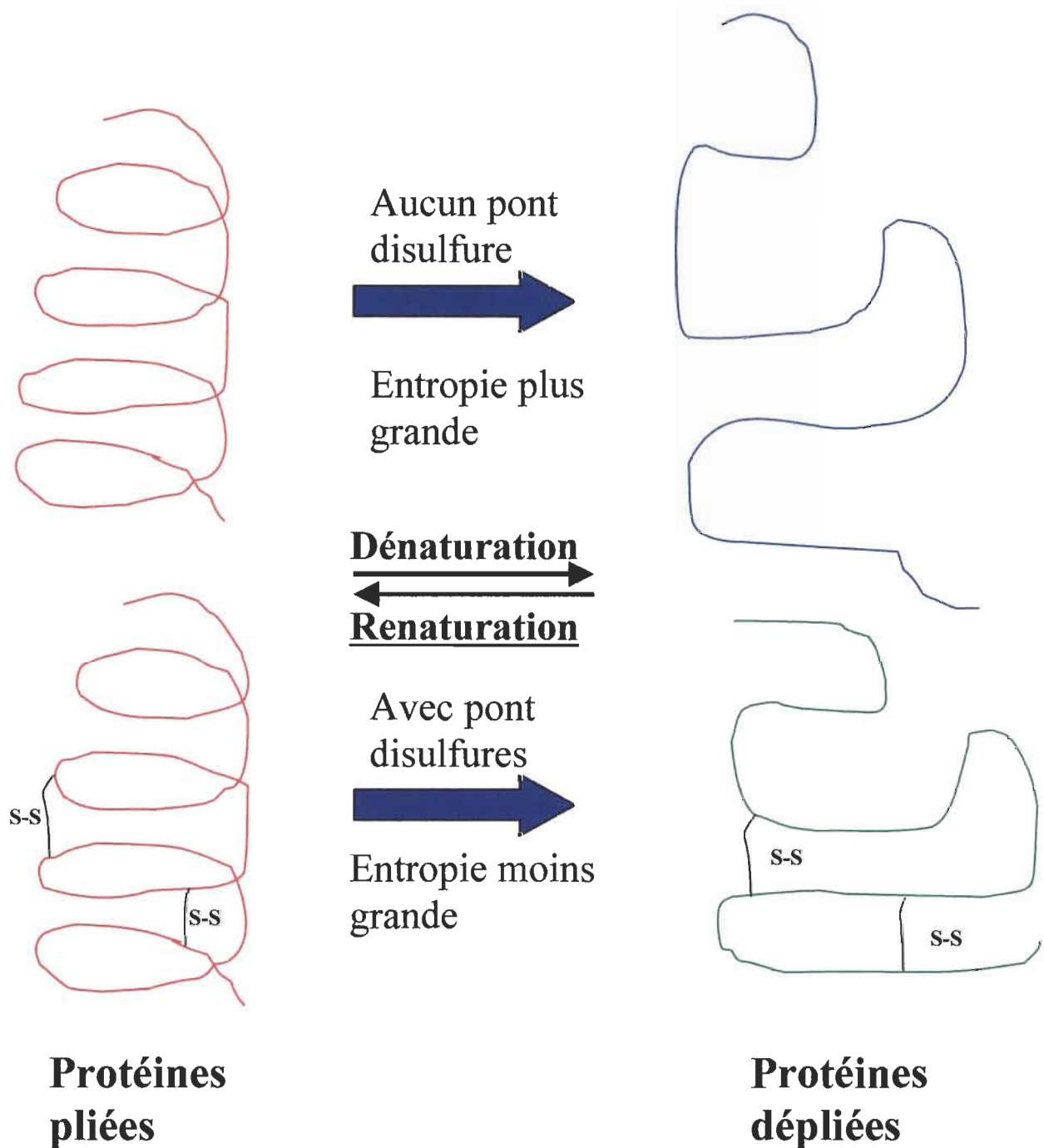


Schéma 1.6 : Déplieement d'une protéine avec et sans ponts disulfures. La présence de ponts disulfures intramoléculaires va diminuer l'entropie et donc déstabiliser l'état dénaturé. L'entropie est diminuée à cause que les ponts vont limiter la liberté de la protéine dans l'espace. Cela va augmenter l'énergie de déplieement et il faudra plus de chaleur pour dénaturer la protéine.

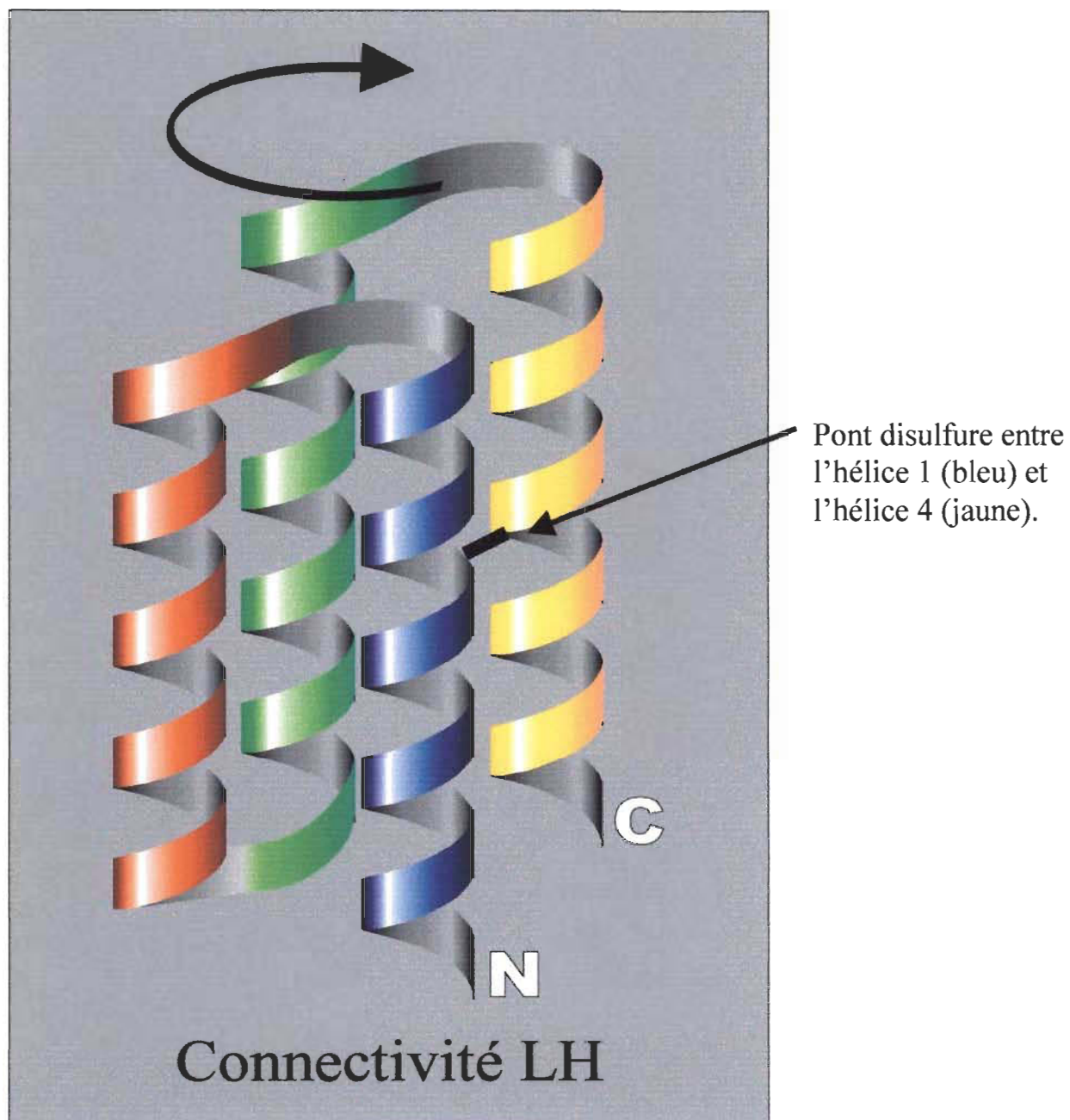


Schéma 1.7 : Structure tertiaire d'un carré d'hélices. Cette figure démontre la position relative choisie pour le pont disulfure. On peut voir que le pont va se faire entre l'hélice 1(bleu) et l'hélice 4 (jaune).

publié). L'analyse de ce produit de dégradation démontre que l'hélice 1 est sensible à la dégradation. En impliquant l'hélice 1 dans le pont disulfure, on souhaite pouvoir renforcer la région sensible à la dégradation. Afin que les distances appropriées pour permettre la formation du pont disulfure soit respectées, il faut modifier les résidus dans la position « a » ou « d » du modèle de l'heptade (schéma 1.4B). Cependant, la structure cristallographique de MB-1 n'est pas connue donc il faut se fier à la structure probable de la protéine, qui est le carré d'hélices choisi lors du design. En se basant sur le modèle de l'heptade (schéma 1.4B), les positions les plus favorables et les plus stabilisantes pour former un pont disulfure sont les positions « d » sur l'heptade (Zhou *et al*, 1993). La raison pour cela est que ces positions peuvent accommoder la géométrie du pont disulfure. Les positions « d » sur le modèle de l'heptade correspondent aux acides aminés 13 et 87 sur la protéine MB-1 (schéma 1.8). Ce sont donc ces positions qui vont être modifiées pour permettre l'incorporation des résidus cystéines pour la formation du pont. Lorsqu'on choisit les positions « d » pour la formation du pont, il faut que la connectivité de la structure tertiaire de la protéine soit une connectivité gauche. Note : La connectivité est définie comme suit; si le noeud d'hélices (schéma 1.9) est placé d'une façon à ce que l'hélice 1 est placée en avant, avec son bout Nt allant du bas vers le haut, la direction que la deuxième hélice prend nous indique la connectivité. Donc, une connectivité gauche va avoir la deuxième hélice à la gauche de l'hélice 1. Pour une connectivité vers la droite, ce sont les positions « a » qui doivent être choisies (schéma 1.9). Les positions des mutations ainsi connues, on procède avec la mutagenèse dirigée pour la création du nouveau mutant (MB-1 left handed ou MB-1LH). Le gène muté est ensuite cloné dans un vecteur d'expression et la protéine est produite pour enfin être caractérisée.

5'- ATG GCT ACG GAA GAC ATG ACC GAC ATG ATG
 M A T E D M T D M M

 ACC ACC TGC TTT AAA ACT ATG CAG CTG TTG
 T T C F K T M Q L L

 ACC AAG TCG GAA CCC ACG GCT ATG GAC GAG
 T K S E P T A M D E

 GCC ACT AAA ACG GCT ACT ACA ATG AAG AAT
 A T K T A T T M K N

 CAT CTT CAA AAC CTG ATG CAG AAG ACT AAG
 H L Q N L M Q K T K

 AAC AAA GAA GAC ATG ACG GAC ATG GCC ACT
 N K E D M T D M A T

 ACG TAC TTC AAA ACG ATG CAG TTG TTA ACG
 T Y F K T M Q L L T

 AAG ACC GAC CCC TCG GCC ATG GAC GAG GCC
 K T E P S A M D E A

 ACG AAG ACG GCT ACA ACC TGC AAA AAT CAT
 T K T A T T C K N H

 CTG CAG AAC TTG ATG CAA AAA GGC GTA GCT
 L Q N L M Q K G V A

 TAA-3'
 F I N

Schéma 1.8 : Séquence du gène muté MB-1LH et de la protéine. Le gène est exprimé en codon (3 nucléotides) de l'ADN alors que la protéine est exprimée par son code à une lettre (par rapport à chacun des codons). On peut voir que les codons 13 et 87 ont été modifiés pour incorporer les deux cystéines pour la formation du pont disulfure.

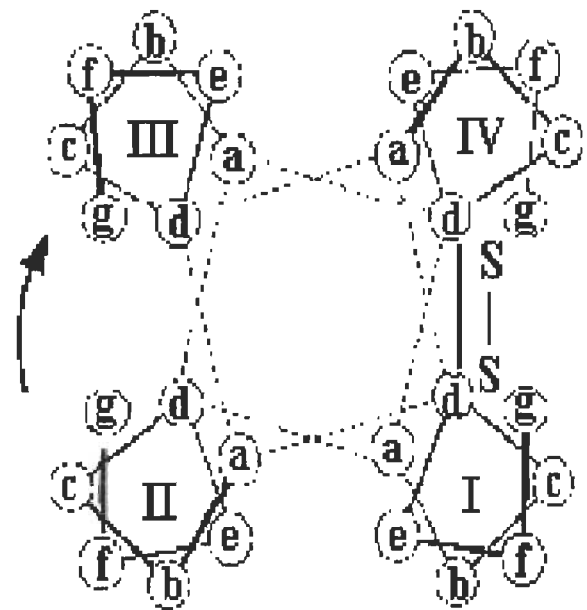
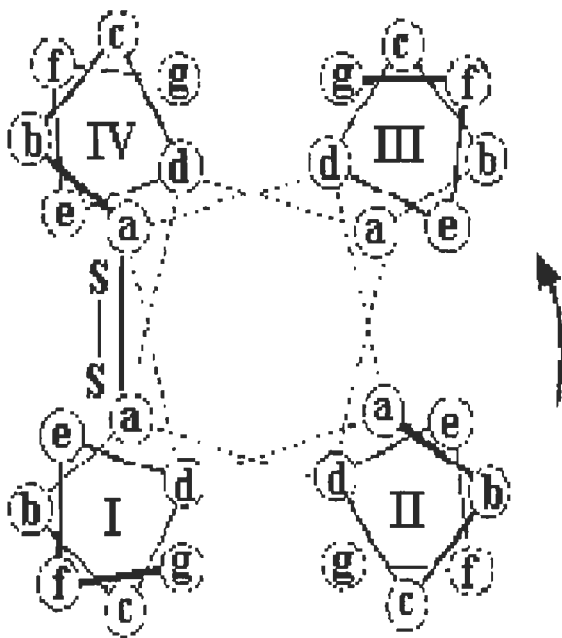
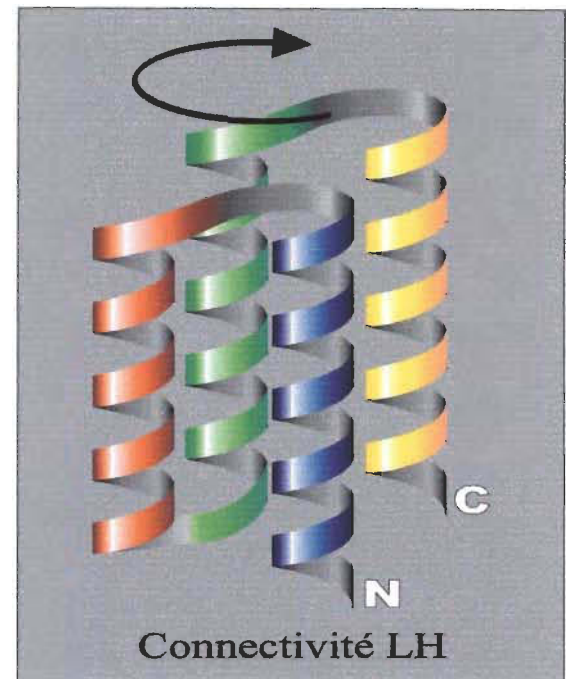
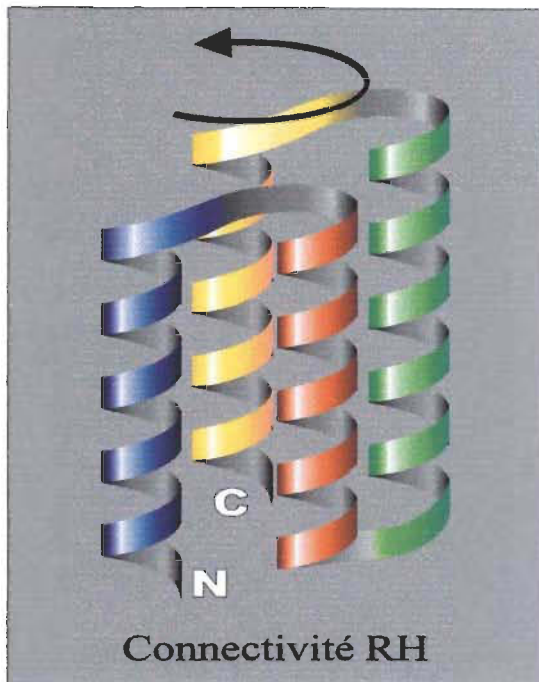


Schéma 1.9 : Connectivité main gauche vs connectivité main droite : Voici des schémas démontrant la différence entre une connectivité main droite ou main gauche. Chez une connectivité main droite, l'hélice 2 va tourner vers la droite et chez une connectivité main gauche, l'hélice 2 va tourner vers la gauche. Dépendant de la connectivité, les positions favorisées pour la formation du pont disulfure vont être différentes. Dans le cas d'une connectivité main droite, les positions favorisées sont les « a », alors que pour une connectivité main gauche, ce sont les « d ». Les positions connues pour être les plus stabilisantes sont les positions « d » (Zhou *et al*, 1993).

1.6. Les buts de mon mémoire

- Design stratégique du pont disulfure pour obtenir une stabilité optimale
- Introduction des cystéines par mutagenèse dirigée permettant la formation du pont disulfure dans MB-1.
- Purification et caractérisation du mutant LH de MB-1.
- Comparaison du nouveau mutant avec un pont disulfure (MB-1LH) avec la protéine mère (MB-1).

1.7. Introduction de l'article soumis à « Protein Engineering »

La recherche effectuée lors de ma maîtrise nous a permis d'écrire un article scientifique intitulé « Optimization of conformational and proteolytic stability in the *de novo* design protein MB-1 by insertion of a disulfide bridge ». Cet article scientifique a été soumis au journal «Protein Engineering » et met en valeur les résultats obtenus durant ma maîtrise. L'article comporte les résultats de caractérisation de la protéine modifiée (MB-1LH) et le design, la création et la purification de la protéine sont expliqués de façon complète pour en permettre sa reproductibilité. Les expériences de caractérisation utilisées pour la caractérisation de la nouvelle protéine sont le dichroïsme circulaire, la fluorospectroscopie et la dégradation protéolytique. Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique qui va nous permettre d'évaluer la présence de structures secondaires dans MB-1LH. La fluorospectroscopie va nous permettre de caractériser 2 choses; 1) la fluorescence avec l'ANSA pour évaluer la compacité du noyau hydrophobe, ce qui va être une indication que la protéine a une structure tertiaire compacte ou non et 2) le quenching (atténuation) de fluorescence avec le citrate qui permet d'évaluer si la

Tyr62 est bel et bien cachée à l'intérieur du noyau hydrophobe de la protéine, tel que prévu par le design. Ces expériences de quenching vont aussi nous donner de l'information sur la fluidité de la structure tertiaire de la protéine. Finalement, la protéine va être testée pour sa résistance à la dégradation protéolytique avec la Pronase E, qui est un mélange de protéases utilisé pour des études de dégradation protéolytique se rapportant aux ruminants. Les résultats de caractérisation pour MB-1LH sont comparés à ceux déjà publiés pour la protéine normale MB-1.

L'implication de mes résultats au niveau de l'impact du pont disulfure sur la stabilité conformationnelle et protéolytique, au niveau du contrôle de la topologie en design de protéines, et aussi dans son application comme supplément nutritif en nutrition animal, sera discutée.

Chapitre 2

Article scientifique soumis à la revue

“Protein Engineering”

**Optimization of conformational and proteolytic stability in the *de novo* designed
protein**

MB-1 by insertion of a disulfide bridge.

Key words: protein design/ proteolytic degradation/ essential amino acids/ protein folding/

Martin Williams, Alain Doucet, Mylène C. Gagnon and Marc Beauregard*

Groupe de Recherche en Energie et Information Biomoléculaires, Département de chimie-
biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières (Québec) G9A
5H7 Canada.

*Correspondence should be sent to:

Dr Marc Beauregard, Professeur de biochimie
Chimie-Biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
CP 500 Trois-Rivières, QC
G9A 5H7, Telephone: +1 819 376-5052
Telefax: +1 819 376-5084
Email: marc_beauregard@uqtr.quebec.ca

Short title: Stabilisation of the protein MB-1.

2.1. Abstract

We have previously reported on MB-1, a designer protein with potential applications in animal nutrition. Comprising a high content of selected essential amino acids, MB-1 should be able to provide limiting nutrients for animals and promote growth and production (Beauregard *et al.* 1995). However, the protein was found to have marginal conformational and proteolytic stability, thus strategies for stabilising MB-1 were elaborated. Here we discuss the synthesis of MB-1LH, a mutant with two cysteines positioned in helices I and IV of the putative conformation, which is characterised by a left-hand connectivity of the helices. Spectroscopic analyses of the mutant MB-1LH show that mutations L13C and M87C are destabilising, favouring the unfolded state. Yet the formation of a disulfide bridge completely overrode the destabilisation afforded by the mutations: the bridged mutant is helical, folded, and is more stable than its parent molecule MB-1. Implications of these findings in the control of topology in protein design and in the applicability of MB-1LH in animal nutrition are discussed.

2.2 Introduction

The expense associated with the use of feed additives used for animal production have led to the study of intracellular production of high quality protein in transgenic crops and others organisms as efficient and less costly sources of essential amino acids (EAAs) (Dyer *et al.*, 1993; Ealing *et al.*, 1994; Williamson, 1996). Three main approaches for the improvement of protein quality in a given organism are being explored (De Lumen *et al.*, 1997; Hefford *et al.*, 1997). The first approach involves the transfer of a gene coding for a high quality protein from one organism to another that is more suitable for farming practices (heterologous expression). In this approach, the amino acid composition of a natural protein is predetermined and may not conform to the desired ratio of EAAs. The second implies the modification of the genes from an organism in a way to insert more selected essential amino acids in its proteins. Attempts to change the amino acid content often destabilize the protein, if not prevent it from folding or being recovered at all (Hoffman *et al.*, 1988; Lawrence *et al.*, 1990; Dyer *et al.*, 1993; De Lumen, 1997). The third approach (which we have chosen) involves the creation of new proteins, with a biased composition of selected essential amino acids (Beauregard *et al.*, 1995; Jaynes *et al.*, 1985). This strategy theoretically allows for full control of the amino acid composition of the protein, an advantage over the previously mentioned options.

Previous efforts to express synthetic proteins with high EAAs content in bacteria (Doel *et al.*, 1980; Jaynes *et al.*, 1985; Beauregard *et al.*, 1994) did not yield high quantities of protein, largely due to lack of stability of the final product, which is possibly attributable to lack of structural stability of the final peptide (among other reasons).

In order to improve on the properties of such new proteins, we have tried to identify dominant folding principles in selected natural proteins and to encode them in a new amino acid sequence. The underlying assumption in this strategy is that by encoding information that confers structure, compactness and stability, a protein that would be stable *in vivo* could be designed, regardless of its biased composition. The ideal protein we were aiming for would 1- have a strong biased composition, with methionine, lysine and other essential amino acids being dominant; 2- be expressed *in vivo* as a soluble, stable, full length protein.

At the time of its design, creation of this ideal protein was a challenge left to be met, since most reported advances in protein design did not involve full length proteins expressed and soluble *in vivo* (Kohn and Hodges, 1998). Nevertheless, the investigation of folding principles in α -helical bundle proteins was relatively advanced (Betz *et al.*, 1993), and because this fold could harbour most of our selected residues, the bundle was selected for our ideal protein. The basic assumptions for the design of the new protein Milk Bundle-1 (MB-1) were as follows: (1) that the range of possible residues in each recurring position in helices in a bundle protein would be determined by the physiochemical properties of the amino acid residues and the topological constraints of the particular location in the tertiary structure, that (2) the driving force for bundle formation would be the “hydrophobic collapse”, the energetically favourable burying of hydrophobic side chains in the interior of the bundle, and that (3) as a result, the loops were relatively unimportant. The design process was an iterative one in which design criteria like secondary structure propensities, charged residue distribution and other global factors that have been shown to be determinant for folding (Cohen and Parry,

1990; Goraj *et al.*, 1990, Beauregard *et al.*, 1991, Hill *et al.*, 1990) were used to refine the initial design (Beauregard *et al.*, 1995).

Characterisation of MB-1 indicated that the design process used resulted in the stable expression of a new, largely helical protein enriched in the desired amino acids (60% in M, T, K and L). After a first round of design, the protein MB-1 was found to have a folded core and low affinity for 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANSA) (Hefford *et al.*, 1999). Its behaviour and expression levels *in vivo* were found to be far superior to earlier attempts in the area of high essential amino acid polypeptide design (McCallum *et al.*, 1997).

Investigation of MB-1's properties did reveal some flaws, however. The proteins appear to associate into dimers that could dissociate into monomers in the presence of a high salt concentration (Hefford *et al.*, 1999). Its melting temperature was found to be very low (39°C), and its resistance to proteases at a physiological temperature was also found to be limited, a possible consequence of partial unfolding (McCallum *et al.*, 1997). As a consequence of these design flaws, efforts in growing crystals were unsuccessful (Grundy *et al.*, 1998).

In order to improve MB-1's folding and resistance to degradation, strategies for a second cycle of design were considered. Because of the absence of an x-ray resolved structure, extensive core redesign and elaborated fold specifying devices had to be ruled out. We chose to attempt the insertion of a disulfide bridge in MB-1 not only for its simplicity, but also for other reasons: 1-an intramolecular disulphide bridge would bring stability to the protein by reducing the entropy of the unfolded state (Wedemeyer *et al.*, 2000); 2- it is a well known stabiliser against proteolysis, probably due to its impact on

protease's access to targets (Mahadevan *et al.*, 1980; McNabb *et al.*, 1994; Spencer *et al.*, 1988); 3- its engineering involves only a small modification in amino acid composition, which is critical for our protein nutritional efficiency.

In this paper, we report on the insertion and formation of a disulfide bridge in the protein MB-1. An extensive investigation of the mutant reveals that the stability afforded by the bridge overrides the destabilizing impact of the cysteines insertion into MB-1's core.

2.3. Materials and Methods

2.3.1. Preparation of the new S-S bridged MB-1 mutant

Substitution of cysteines in position 13 and 87 of MB-1 was performed using the oligo-directed mutagenesis kit « Altered Sites® II» (Promega). The mutational oligonucleotides (**1** for position 13; **2** for position 87, shown below with the corresponding MB-1 sequences) were purchased from GibcoBRL/Life Technologies, purified using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and phosphorylated.

MB-1 : 5'-ATG ATG ACC ACC CTG TTT AAA ACT ATG-3'

Oligo 1: L13C : 5'-ATG ATG ACC ACC TGC TTT AAA ACT ATG-3'

MB-1 : 5'-ACG GCT ACA ACC ATG AAA AAT CAT CTG-3'

Oligo 2: M87C : 5'-ACG GCT ACA ACC TGC AAA AAT CAT CTG-3'

The mutations were then confirmed by dideoxynucleotide sequencing using T7 Sequenase kit (Amersham Life Science). The mutated MB-1 gene was cloned back in the pCMG20 4-X expression vector (Beauregard *et al.*, 1995) and positive clones were checked again by DNA sequencing.

2.3.2. Protein expression and purification

Bacteria carrying the mutant vectors were grown in 1 L of LB Miller medium (Difco) to an O.D. of 0.6. Transcription was induced using 1 mM isopropylthio-β-D-

galactoside (IPTG) for 3 hours. The cells were then harvested by centrifugation at 3,000 x g. The purification procedure was essentially as described in Beauregard *et al.*, 1995 with few modifications. Precipitated cells were resuspended in ice-cold column buffer (10 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM ethylenediamine-tetraacetate (EDTA), 1 mM sodium azide (NaN₃), pH 7.4), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), ethylene glycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetate (EGTA), benzamidine-hydrochloride and benzamide were added to a final concentration of 0.1, 10, 2 and 2 mM, respectively. Cells were then lysed by ten 30-sec sonication pulses using a Branson Sonifier 250 at 60% output control. The sonicate was centrifuged at 11,500 x g for 30 minutes at 4°C.

The supernatant was then loaded onto a 15 mL amylose column. (maltose binding protein) MBP-MB-1 was eluted by washing the column with column buffer containing 10 mM maltose (elution buffer). Pooled peak fractions were placed in dialysis tubing (Spectra/Por; MWCO 3,500 Da) with 50 µL factor Xa per 10 mL fusion protein. The bag was placed in 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 3 mM CaCl₂ (cleavage buffer) overnight at 4°C. The following morning, the bag was transferred to Tris-EDTA (TE) buffer, pH 8.0. After a 3-hour dialysis, the sample was applied to DEAE-Sepharose equilibrated in TE buffer, pH 8.0 (Fast Flow; Pharmacia) and washed with the same buffer. MB-1LH was collected as the flow-through. The different fractions were analysed for protein content by the bicinchoninic acid (BCA) assay (see below) and the positive fractions were pooled and concentrated using BIOMAX-5K concentrators (Millipore).

2.3.3. Protein quantification and electrophoresis

Protein concentration was determined by the BCA assay (Sigma), using bovine serum albumin (BSA) as the standard. The protein was visualised by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 12% polyacrylamide-tricine gels, followed by silver nitrate staining. SDS-PAGE experiments were conducted prior to measurements to confirm protein purity.

2.3.4. Quantification of cysteine residues and assessment of bridge formation

Chemical modification of the cysteine residues by iodoacetamide and iodoacetate was performed as described in Hollecker (1989). Comparison of the electrophoretic mobility of the reduced and non-reduced form of the MB-1 mutant was done by SDS-PAGE (Hollecker, 1989).

2.3.5. Conformational investigation by circular dichroism (CD)

Protein samples were prepared at a concentration of 0.6 mg/mL with TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA). Dithiothreitol (DTT) was added to a final concentration of 10mM where specified. The samples were then degassed and equilibrated 20 minutes at 20°C before measurements. Spectra were measured with a Jasco J-720 spectropolarimeter, which was routinely calibrated with a 0.06% (W/V) ammonium (+)-10-camphorsulfonate solution. For measurements in the far-UV region a quartz cell with a path length of 0.01 cm was used. Ten scans were accumulated at a scan speed of 20 nm per minutes, with data being collected at every nm from 178 to 260 nm. Sample temperature was maintained at 20°C using a Neslab RTE-111 circulating water bath

connected to the water-jacketed quartz cuvettes. Spectra were corrected for buffer signal and conversion to $\Delta\epsilon_{MRW}$ (mean residue weight) was performed with the Jasco Standard Analysis software. Secondary structure calculations were performed using the CDSstr program developed by Johnson (1999), using default settings.

2.3.6. Thermal denaturation

Samples were prepared as described in the preceding section. In order to measure thermostability, temperature was increased from 20 to 85 °C at a rate of 30 °C per hour using a Neslab RTE-11 controlled by the Jasco spectropolarimeter software. CD spectra were collected at every 5°C, from 200 to 260 nm, at a scan speed of 20 nm/min, and secondary structure calculations were performed as described above. In order to assess reversibility of thermal denaturation, the protein solutions were cooled down at a rate of 30°C per hour, and spectra were measured at 70, 50 and 20 °C.

Thermal stability was calculated assuming a unimolecular, two-state process as previously described (Pace *et al.*, 1989). The percentage of helices calculated at various temperature was used as the property (y) indicative of the extent of unfolding. In the folded state, the parameter $y = y_f$ and the fraction of folded protein f_f is equal to 1. When the protein is unfolded, the parameter $y = y_u$, and the fraction of unfolded protein f_u is equal to 1. For intermediate states, y is given by $y_f f_f + y_u f_u$. Thus, by measuring y , we can calculate the fraction of protein unfolded: $f_u = (y_f - y)/(y_f - y_u)$. The equilibrium constant for the unfolding process is $K_u = f_u/(1-f_u)$ and melting temperatures (T_m) are obtained at $K_u = 1$ (Pace *et al.*, 1989).

2.3.7. ANSA fluorescence enhancement

Protein concentration was adjusted to 0.2 mg/mL with TE buffer and equilibrated at room temperature (RT) for 1 hour. Then ANSA was added to a final concentration of 10 μ M and equilibrated 5 minutes prior to measurements.. Spectra were recorded using an LS50-B Perkin-Elmer fluorometer with an excitation wavelength of 380 nm. Spectra were collected from 410 to 550 nm, using a band pass of 5 nm. Correction for buffer signal and for the effect of DTT on ANSA was keyed in when applicable.

2.3.8. Fluorescence quenching measurements

Protein concentration of samples was adjusted to 0.2 mg/mL with TE buffer and equilibrated at room temperature (RT) for 1 hour. Where specified DTT was added to a final concentration of 10mM and equilibrated at RT 15 minutes before adding the quencher citrate (final concentration 0.25 M). Control samples were exposed to 0.7 M NaCl in order to keep the same ionic strength as in the samples exposed to 0.25 M citrate. Samples were excited at 280nm and tyrosine fluorescence spectra were recorded from 290nm to 350nm with a 12 nm band pass. Spectra were then corrected for buffer signal before analysis. The effect of DTT on tyrosine fluorescence was corrected when needed.

2.3.9. Proteolytic Degradation measurements

Proteins were dialysed against 2000 volumes of borate-phosphate buffer (pH 6.8) at 4°C overnight. Experiments were then carried out as described by Krisnamoorthy *et al.*, 1983; with few modifications as described in Morrison *et al.*, in press. Reactions were stopped by the addition of 2% SDS buffer followed by heating for 3 minutes at 100°C.

Samples were then analysed on SDS-PAGE followed by silver nitrate staining. The amount of protein remaining after incubation with proteases was determined by measuring the optical density of each band using the image analysis system Imaging Research MCID. Cytochrome c (horse heart) cat no.C-7752 (Sigma) was used as a reference protein for all degradation runs in order to correct for possible variations in crude proteolytic activity.

2.4. Results

2.4.1. Design strategy

The putative modifications to the MB-1 structure is illustrated in Figure 2.1. The design strategy used here focused on two aspects: 1- the restrictive effect of a covalent bond between remote residues on the protein as a whole; and 2- the precise location of the cysteines which will permit formation of a disulfide bridge. By choosing positions as far apart as possible for the mutations, one would reduce the entropy gain upon unfolding for most of the protein (Klink *et al.*, 2000). Thus, a bridge between helices I and IV would enclose a larger part of the polypeptide than a bridge involving other helices. Helix I was also considered for insertion of a cysteine because this segment of MB-1 sequence was found to be sensitive to proteolytic degradation (Hefford and Beauregard, unpublished). The restriction of helix I might help prevent this phenomenon. The exact position of cysteines in helices I and IV must allow for proper positioning of the sulfhydryl groups, and should minimise strain induced by bridge formation. On the basis of geometric models built for similar proteins (Zhou *et al.*, 1993), it appeared that position "d" of the heptad pattern used for MB-1 design would offer the best geometry

for formation of a bridge. Therefore, considering the above parameters, residues L13 and M87 were selected for mutation to cysteines. Figure 2.1 shows the expected location of the bridge in the mutant, assuming it folds as per design. Note that for proper alignment of positions "d" in helices I and IV, a left hand connectivity of the helices has to be assumed (i.e. when the bundle is positioned in a way that helix I is placed at the front of it, with its N-terminus down, then helix II is placed on the left of helix I).

2.4.2. Characterisation of MB-1LH structures

The presence of two cysteines in MB-1LH was confirmed by cysteine derivatization with mixtures of iodoacetamide and iodoacetate, in agreement with the DNA sequence of the expression vector (data not shown). MB-1LH was then analysed in the absence or presence of the reductive agent DTT in order to characterise the effect on mutations and bridge formation separately. Secondary structure analysis of the mutant was performed using circular dichroism (Figure 2.2). The spectra measured for the protein with its bridge closed (no DTT) are typical of a helical protein, and calculations indicated a 59% helical content, which compares with the original protein MB-1's content (Beauregard *et al.*, 1995). Addition of DTT opened the bridge and led to a nearly complete loss of helices in MB-1LH, down to 10%. Reversibility of DTT-induced unfolding was verified by CD measurements. After dialysis of DTT from the solution, MB-1LH CD spectra were similar to the native spectra, except for a slight drop in signal leading to a 50% helical content (data not shown).

Protection of tyrosine 62 in MB-1LH was assessed by fluorescence quenching measurements. As shown in Figure 2.3, quenching of tyrosine by citrate is low,

indicating that a compact tertiary structure is achieved in the mutant. Cleavage of the disulfide bridge increases tyrosine quenching by citrate, indicating that it became more exposed. These results corroborate the CD analysis (Figure 2.2) in showing that the MB-1LH fold is destabilised when the bridge is broken.

The effect of mutations on MB-1LH hydrophobicity was investigated with the amphiphilic fluorescent probe ANSA. ANSA fluorescence maximum shifted from 520 to 480 nm, and increased by a factor of 8.6 when mixed with the mutant with its bridge formed (Figure 2.4). Such an enhancement factor on ANSA fluorescence indicates that MB-1LH is more hydrophobic than MB-1 is (Morrison *et al.*, 1999). This may be ascribed to an increased fluidity in the core, which may result from the mutations or bridge formation. Addition of DTT decreased MB-1LH affinity for ANSA as a consequence of unfolding, and not from a gain in compactness, as demonstrated by CD and fluorescence quenching experiments.

Size-exclusion chromatography revealed that MB-1LH was different from the parent MB-1 regarding self association. MB-1LH with the S-S bridge closed migrated predominantly as a monomer (at 12 kDa, not shown), whereas MB-1 behaves like a dimer under similar conditions (Hefford *et al.*, 1999). Thus, it appears that the insertion of the disulfide bridge helped in specifying the target fold.

2.4.3. Effect of the bridge on MB-1LH stability

Conformational stability of MB-1LH was measured using CD. Figure 2.5 shows that MB-1LH denatures at 43°C, a gain of 4° over MB-1's denaturation temperature (McCallum *et al.*, 1997). Approximately 90% of the helical content was recovered after

renaturing the protein by cooling to room temperature as described in Methods, whereas the parent molecule MB-1 could not be refolded under similar experimental conditions (McCallum *et al.*, 1997). When the protein was left to refold for 16 hours at room temperature, the CD spectra showed complete refolding of the protein (not shown). Thermal denaturation of MB-1LH in the presence of DTT was attempted but no transitions were found. This is consistent with other analyses showing that the protein unfolds significantly when the bridge opens.

Proteolytic degradation experiments were carried out as described in Figure 2.6. In the absence of DTT (bridge closed), 50% of MB-1LH was left undegraded after a 53 minutes treatment. For MB-1, the protein's half-life was limited to 28 minutes using the same experimental conditions (Morrison *et al.*, in press). Degradations were performed in the presence of DTT and higher degradation rates were measured (data not shown). However, difficulties encountered due to the inhibitory effect of DTT on the proteolytic activity and the need to prevent reoxidation of the disulfide bridge, strongly limit the usefulness of these data. Nevertheless, the degradation experiments are fully compatible with the assessment of conformational stability shown in Figure 2.5: the disulfide bridge has a significant stabilizing effect on MB-1LH.

2.5. Discussion

Encoding folding information into peptides or proteins using a limited number of amino acids (biased content) has been performed with variable success by a number of designers (Riddler *et al.*, 1997, Betz *et al.*, 1993, Beauregard *et al.*, 1995). First generation designs have often suffered from imperfections or flaws, and MB-1 is no exception in this regard. The lack of stability not only compromised MB-1's potential as a feeding additive to be produced *in vivo*, but also hampered our attempts to grow useable crystals (Grundy *et al.*, 1997). The absence of x-ray coordinates drastically limits the possibilities available to us with regards to correcting the protein's design.

Among the simple fold stabilising staples that are often used in the field, the disulfide bridge was chosen. This fold staple has an obvious advantage over salt bridges, hydrogen bonds and metal binding sites: once formed, it cannot be broken by unfolding and/or proteolytic degradation. Further, proper positioning and formation of a disulfide bond may provide reliable information on tertiary topology of proteins (Wedemeyer *et al.*, 2000). The insertion of any fold staple in MB-1 presents some difficulties, however, since its detailed structure is not available yet. Misplacement of fold specifiers may lead to conformational destabilisation, as previously observed (Lutgring and Chmielewski, 1994; Zhou *et al.*, 1993).

The various techniques used here all show that the simple strategy adopted for insertion of a disulfide bridge worked. The bridge brings fold specificity, conformational stability and enhanced proteolytic resistance to MB-1LH, when compared to its predecessor MB-1. On the other hand, an increased fluidity in the core was detected by

ANSA fluorescence measurements, which may result from the replacement of positions 13 and 87.

This hypothesis is compatible with the behaviour of the protein with its bridge cleaved. Experiments done in the presence of DTT clearly showed that MB-1LH unfolded at room temperature, under conditions where MB-1 (with original sequence) is folded and helical. This indicates that the mutations L13C and M87C are extremely destabilising for the protein.

The constraints used to determine the position of the bridge (see Results) did not allow for any consideration of the impact of the residue substitution on the protein stability. Distances and angles for the putative disulfide bridge were considered, maximal restriction of the chain which reduces the entropy gain upon unfolding, and finally, providing protection in the N-terminal region against proteolytic degradation, dominated the strategy. On the other hand, the choices made may be questioned on several counts: cysteine does not have the property profile (size, hydrophobicity) that matches the consensus profile for the positions 13 and 87, where leucines are the preferred residues; cysteine is a poor helix former (Blaber *et al.*, 1993); secondary structure predictions clearly shows a break in helix propensity in the regions involved when the mutations to cysteines are considered (data not shown); and finally, the positions chosen are part of the core, where a protein is most sensitive to mutations. Fortunately, forming the bridge appears to override the destabilising effects of the mutations, except for the increased core fluidity.

The fold targeted for MB-1LH is the bundle with a left-hand connectivity shown in Figure 2.1. All results presented here for the mutant with its bridge formed are

compatible with the target conformation. Looking back on the design criteria, it appears that no special attention was given to the secondary structure elements connectivity since proteins with either connectivity were considered in defining consensus residues properties (Beauregard *et al.*, 1995). At variance with topological features such as helix relative orientation (Monera *et al.*, 1996), degree of association (Betz *et al.*, 1993), and bundle twist (Harbury *et al.*, 1998), this topological parameter has received little attention if any, from researchers in this field. The results shown here suggest that the MB-1 sequence is compatible with the left-hand connectivity favoured by the bridge, whereas most natural bundles have right-handed connectivity. In order to identify sequence information that specifies connectivity in bundles, a comparative survey of bundles with different connectivities has been initiated in our laboratory. On the basis of this analysis and by comparing MB-1LH sequence with typical or consensus sequences from natural bundles, it should be possible to identify sequence features that control connectivity.

With regards to MB-1LH applicability as a source of EAAs to be expressed *in vivo*, it appears that the mutations used here will have a deleterious impact on yield, unless formation of the bridge is made possible shortly after synthesis. A proper selection of the compartment for its expression in a given transgenic organism and/or translocation by the addition of a leader peptide to an environment that favours bridge formation would minimise this limitation. Crystallisation experiments with MB-1LH have been encouraging so far and it is hoped that solving its structure will permit a better understanding and control of the protein's behaviour, with the bridge closed or open.

2.6. Acknowledgements

This work was supported by a grant from Dairy Farmers of Canada and the Natural Sciences and Engineering Research Council awarded to M.B. M. W. was supported by a scholarship from Université du Québec à Trois-Rivières.

2.7. References

- Beauregard,M., Dupont,C., Teather,R.M. and Hefford,M.A. (1995) *Biotechnology*, 13, 974-981.
- Beauregard,M., Goraj,K., Goffin,V., Heremans,K., Goormagthigh,E., Ruysschaert,J.M. and Martial,J.A. (1991) *Protein Eng.*, 4, 745- 749.
- Beauregard,M., Hefford,M.A. and Teather,R.M. (1994) *Biotechniques*, 16, 831-838.
- Betz,S.F., Raleigh,D.P. and Degrado,W.F. (1993) *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 3, 601-610.
- Blaber,M., Zhang,X. and Matthews,B.W. (1993) *Science*, 260, 1637-1640.
- Cohen,C. and Parry,D.A. (1990) *Proteins*, 7, 1-15.
- DeLumen,B.O., Krenz,D.C. and Revilleza,J. (1997) *Food Technol.*, 51, 67-70.
- Doel,M.T., Eaton,M., Cook,E.A., Lewis,H., Patel,T. and Carey,N.H. (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8, 4575-4592.
- Dyer,J.M., Nelson,J.W. and Murai N. (1993) *J. Protein Chem.*, 12, 545-560.
- Ealing,P.M., Hancock,K.R. and White,D.W. (1994) *Transgenic Res.*, 3, 344-534.
- Goraj,K., Renard,A. and Martial,J.A. (1990) *Protein Eng.*, 3, 259-266.
- Grundy,J., Hefford,M.A., Morrison,J.J., MacCallum,J.D., Wirtanen,L. and Beauregard,M. (1997) *Proceedings of Spacebound 97/9th International Symposium on Experimental Methods for Microgravity Materials Science*, Montréal, Canada, May 1997, pp. 263-274.
- Grundy,J., Morrison,J.J., MacCallum,J.D., Wirtanen,L. and Beauregard,M. (1998) *J. Biotechnol.*, 63, 9-15.
- Harbury,P.B., Plecs,J.J., Tidor,B., Alber,T. and Kim,P.S. (1998) *Science*, 282, 1462-1467.
- Hefford,M.A. (1997) *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, 14, 191-210.
- Hefford,M.A., Dupont,C., MacCallum,J., Parker,M.H. and Beauregard,M. (1999) *Eur. J. Biochem.*, 262, 467-474.
- Hill,C.P., Anderson,D.H., Wesson,L., DeGrado,W.F. and Eisenberg,D. (1990) *Science*, 249, 543-546.

- Hoffman,L.M., Donaldson,D.D. and Herman,E.M. (1988) *Plant Mol. Biol.*, 11, 717-729.
- Hollecker,M. (1989) In Creighton,T.E. (ed.), *Protein structure, a practical approach*. IRL press, Oxford, pp. 145-153.
- Jaynes,J., Langridge,P., Anderson,K., Bond,C., Sands,D., Newman,C.W. and Newman,R. (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 200-205.
- Johnson,W.C. (1999) *Proteins*, 35, 307-312.
- Klink,T.A., Woycechowsky,K.J., Taylor,K.M. and Raines,R.T. (2000) *Eur. J. Biochem.*, 267, 566-572.
- Kohn,W.D. and Hodges,R.S. (1998) *Trends Biotechnol.*, 16, 379-389.
- Krisnamoorthy,U., Sniffen,C.J., Stern,M.D. and Van Soest,P.J. (1983) *Brit. J. Nutr.*, 50, 555-568.
- Lawrence,M.C., Suzuki,E., Varghese,J.N., Davis,P.C., Van Dontelaar,A., Tulloch,P.A. and Colman,P.N. (1990) *EMBO J.*, 9, 9-15.
- Lutgring,R. and Chmielewski,J. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 6451-6452.
- MacCallum,J.D., Hefford,M.A., Omar,S. and Beauregard,M. (1997) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 66, 83-93.
- Mahadevan,S., Erfle,J.D. and Sauer,F.D. (1980) *Anim. Sci.*, 50, 723-728.
- McNabb,W.C., Spencer,D. and Higgins,T.J. (1994) *J. Sci. Food Agric.*, 64, 53-59.
- Monera,O.D., Sönnichsen,F.D., Hicks,L., Kay,C.M. and Hodges,R.S. (1996) *Protein Eng.*, 9, 353-363.
- Morrison,J.J., McNally,D., Navidzadeh,A. and Beauregard,M. *Appl. Biochem. Biotech.*, in press.
- Pace,C.N., Shirley,B.A. and Thomson,J.A. (1989) In Creighton,T.E. (ed), *Protein structure, a practical approach*. IRL press, Oxford, pp. 311-337.
- Riddle,D.S., Santiago,J.V., Bray-Hall,S.T., Doshi,N., Grantcharova,V.P., Yi,Q. and Baker,D. (1997) *Nature Struct. Biol.*, 4, 805-810.
- Spencer,D., Higgins,T.J.V., Freer,M., Dove,H. and Coombe,J.B. (1988) *Brit. J. Nutr.*, 60, 241-247.
- Williamson,M. (1996) *Trends Biotech.*, 14, 449-450.

Wedemeyer, W., Welker, E., Narayan, M. and Scheraga, H. A. (2000) *Biochemistry*, 39, 4207-4216.

Zhou, N. E., Kay, C. M. and Hodges, R. S. (1993) *Biochemistry*, 32, 3178-3187.

2.8. Figure legends

Fig. 2.1: Design of MB-1LH. The pictogram shows the putative disulfide bridge (tick line) to be formed between helices I and IV. Top: ribbon model for an α -helical bundle; Below: end-on view, showing the canonical heptad pattern used to design MB-1. Positions "d" are chosen for mutations to cysteines.

Fig. 2.2: Circular dichroism spectra of MB-1LH with its bridge open (+DTT) or closed (-DTT). The presence of DTT promotes unfolding, as seen by the decrease in ellipticity at 224 nm and 208 nm, and the appearance of a minimum at 204 nm.

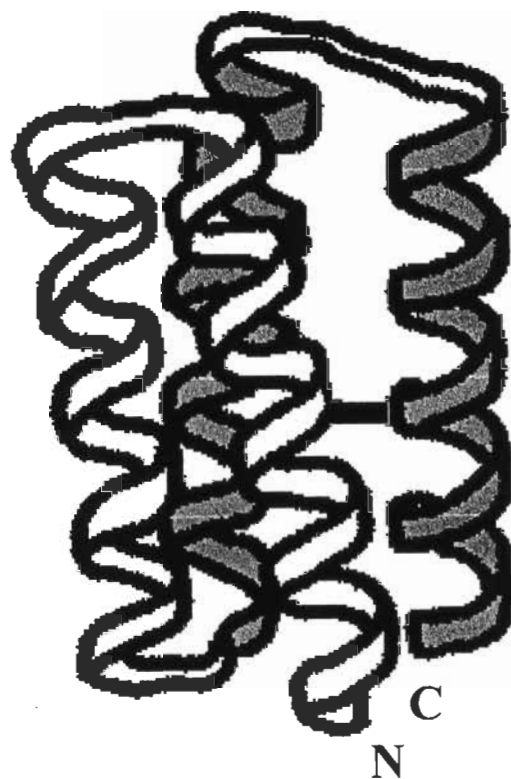
Fig. 2.3: Quenching of MB-1LH tyrosine 62 fluorescence induced by citrate. Curve 1: MB-1LH without citrate; curve 2: MB-1LH with 0.25 M sodium citrate; curve 3: MB-1LH pre-treated with DTT, with sodium citrate.

Fig. 2.4: Enhancement of ANSA fluorescence by MB-1LH. Results for 10 μ M ANSA alone (curve 1); ANSA with MB-1LH (curve 2) and MB-1LH pre-treated with DTT, then mixed with ANSA (curve 3). When exposed to the mutant protein, ANSA fluorescence shifts from 515 to 480 nm, and its intensity increases, as a result of binding to hydrophobic clusters in folded MB-1LH. Unfolding by DTT destroys the hydrophobic niches in MB-1LH, decreasing ANSA fluorescence.

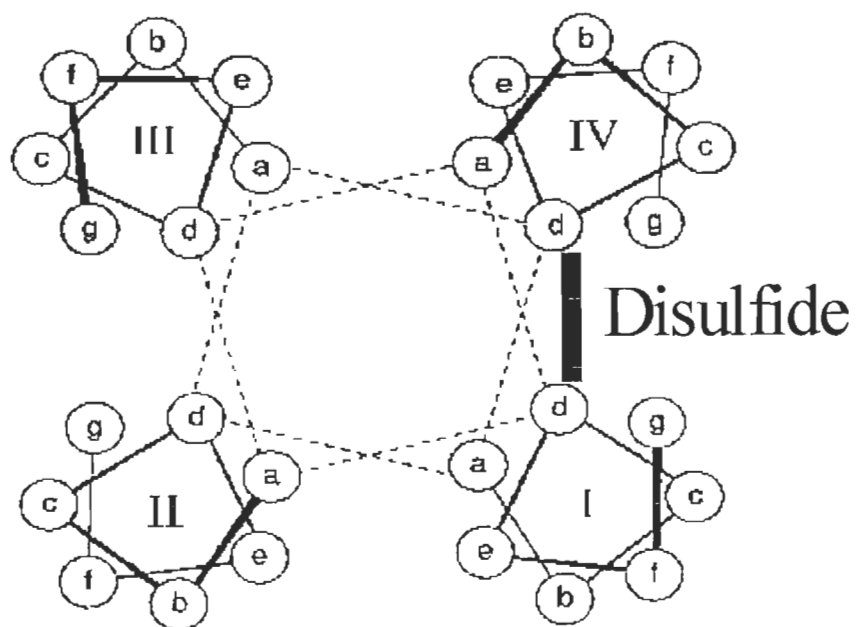
Fig. 2.5: Thermal denaturation curve for MB-1LH. The decrease in α -helical content induced by heating indicated a melting temperature of 43°C.

Fig. 2.6: Degradation of MB-1 and mutant by Pronase E. MB-1 resistance to proteolytic degradation (open circles) is enhanced by the addition and formation of the disulfide bridge in MB-1LH (closed diamonds).

Figure 2.1



Side View



Top View

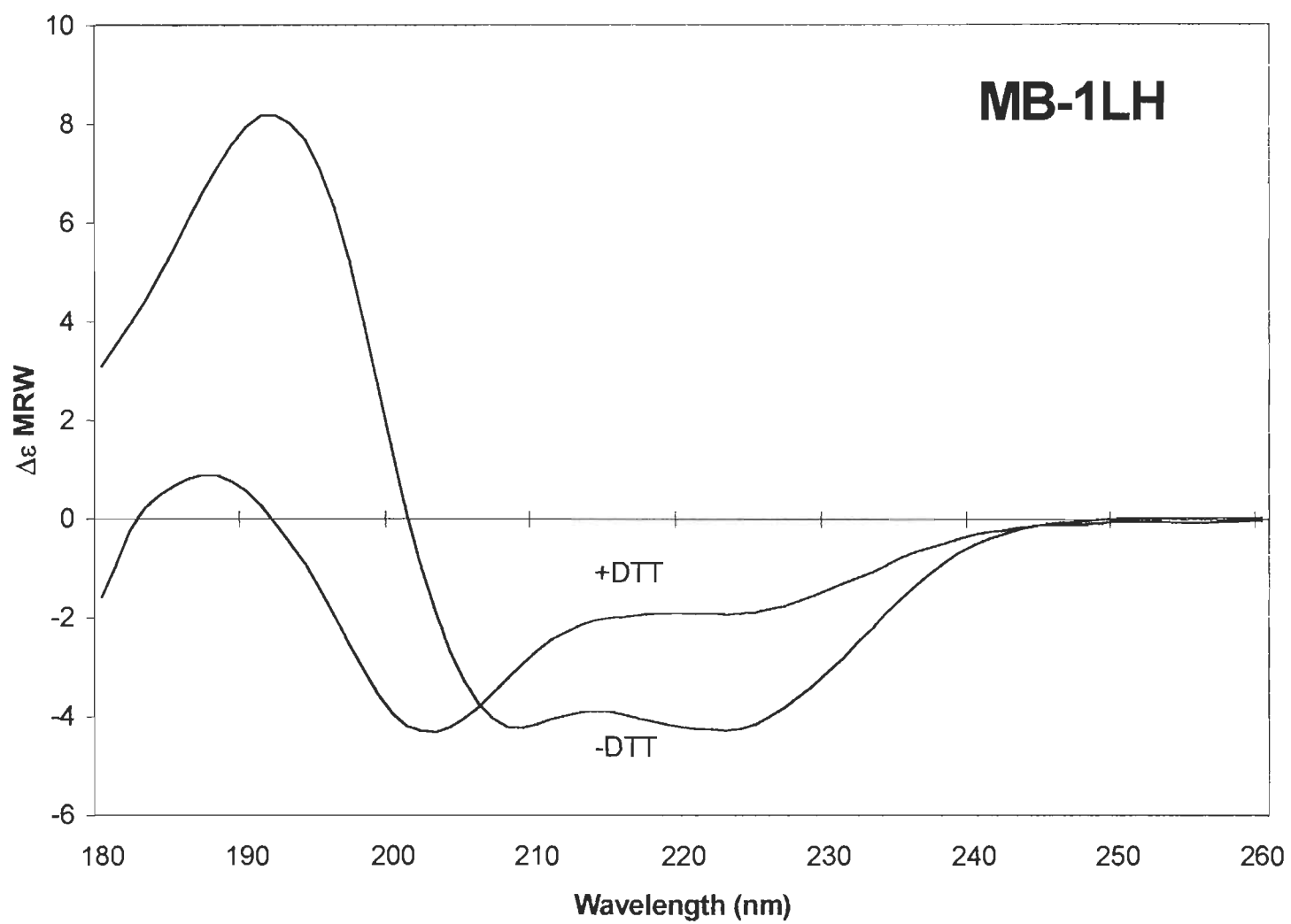
Figure 2.2

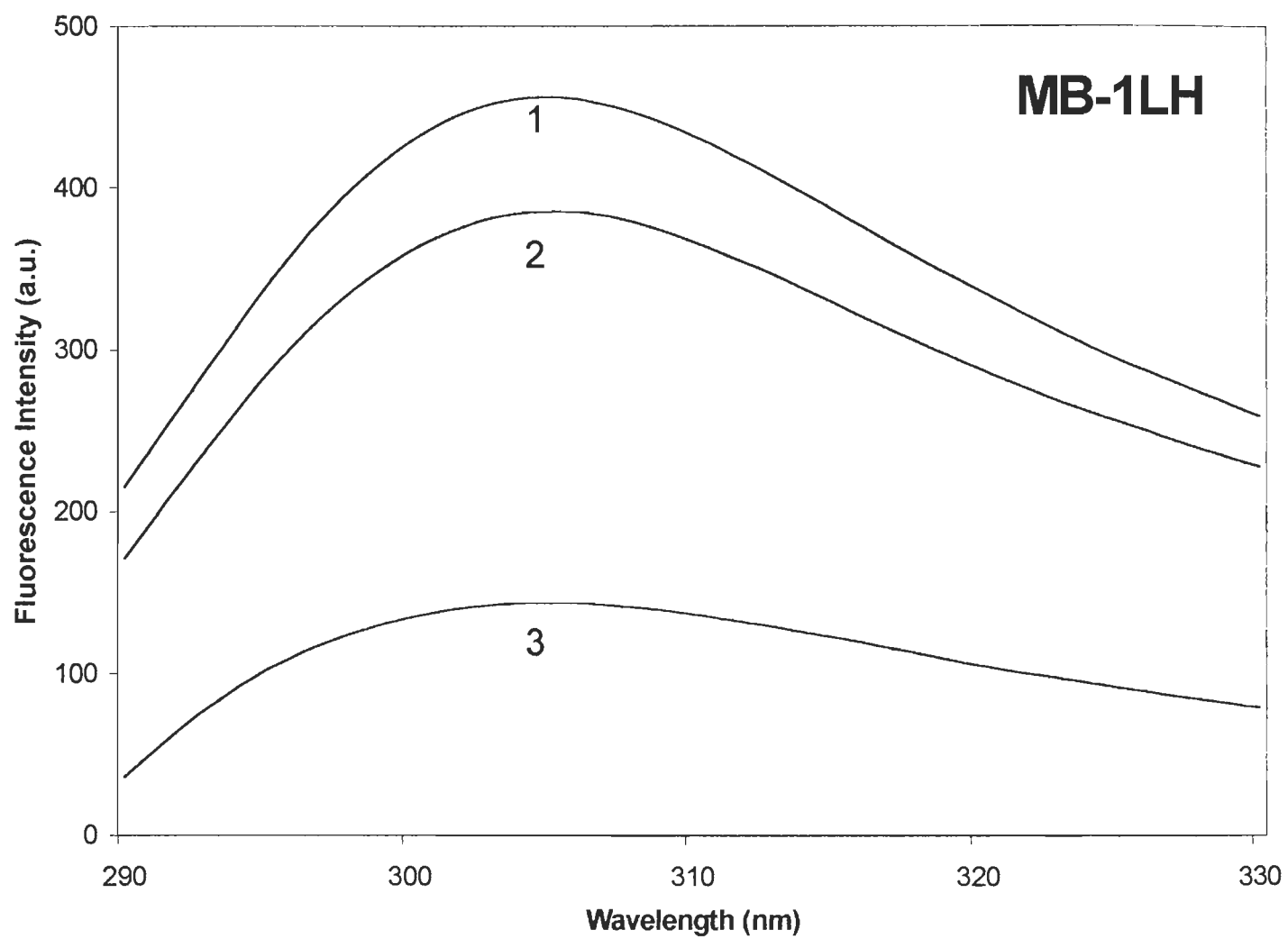
Figure 2.3

Figure 2.4

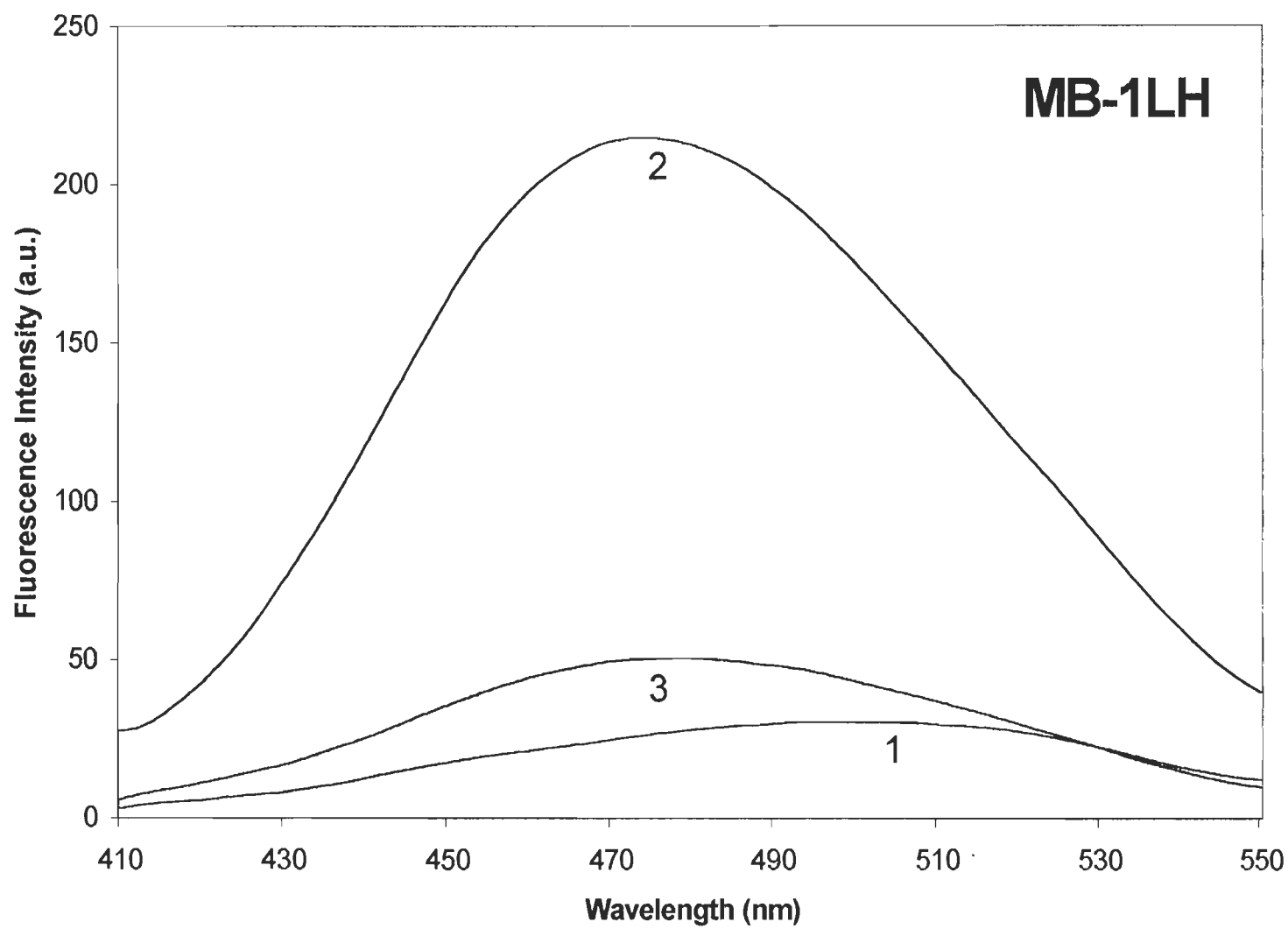


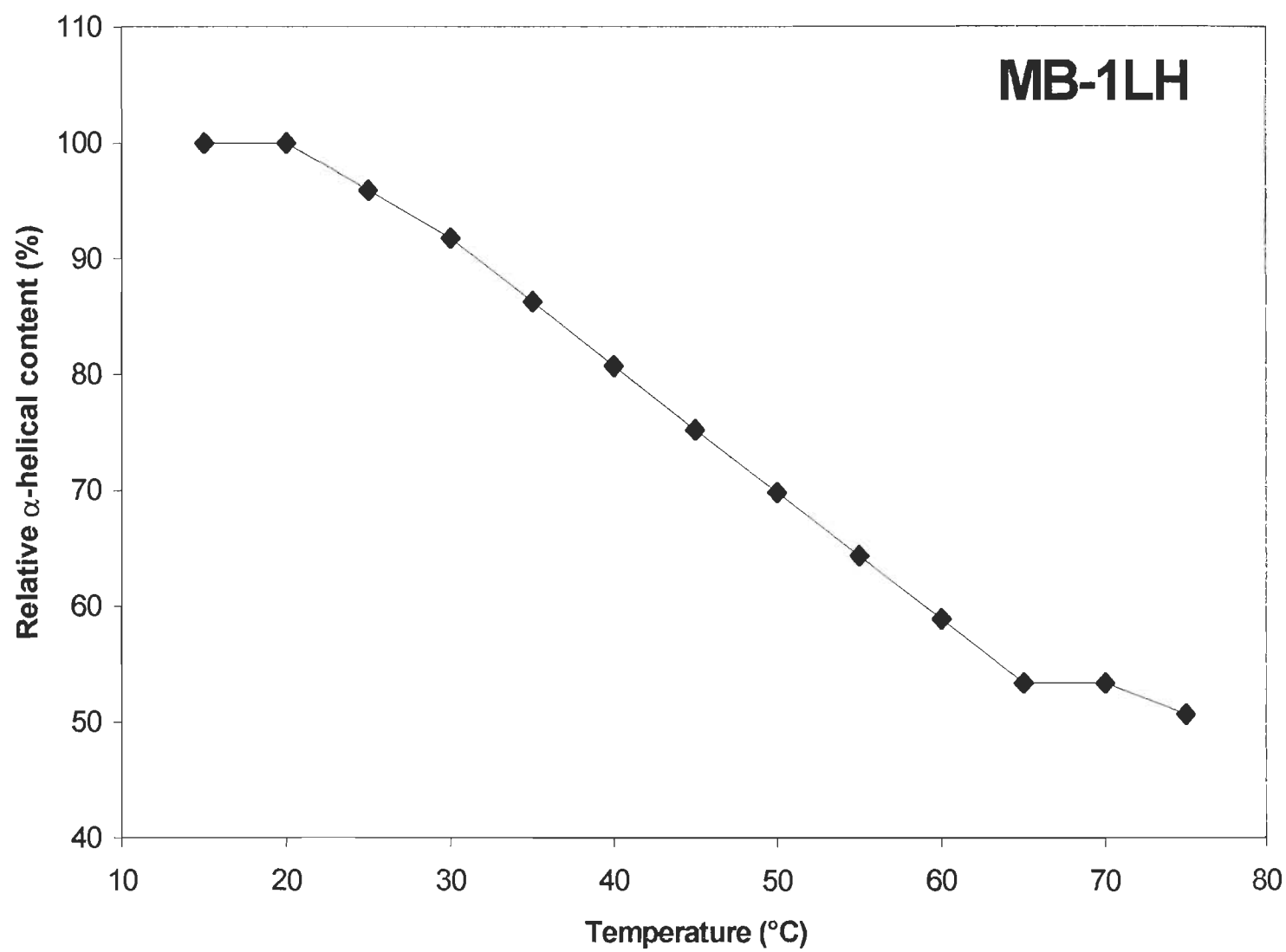
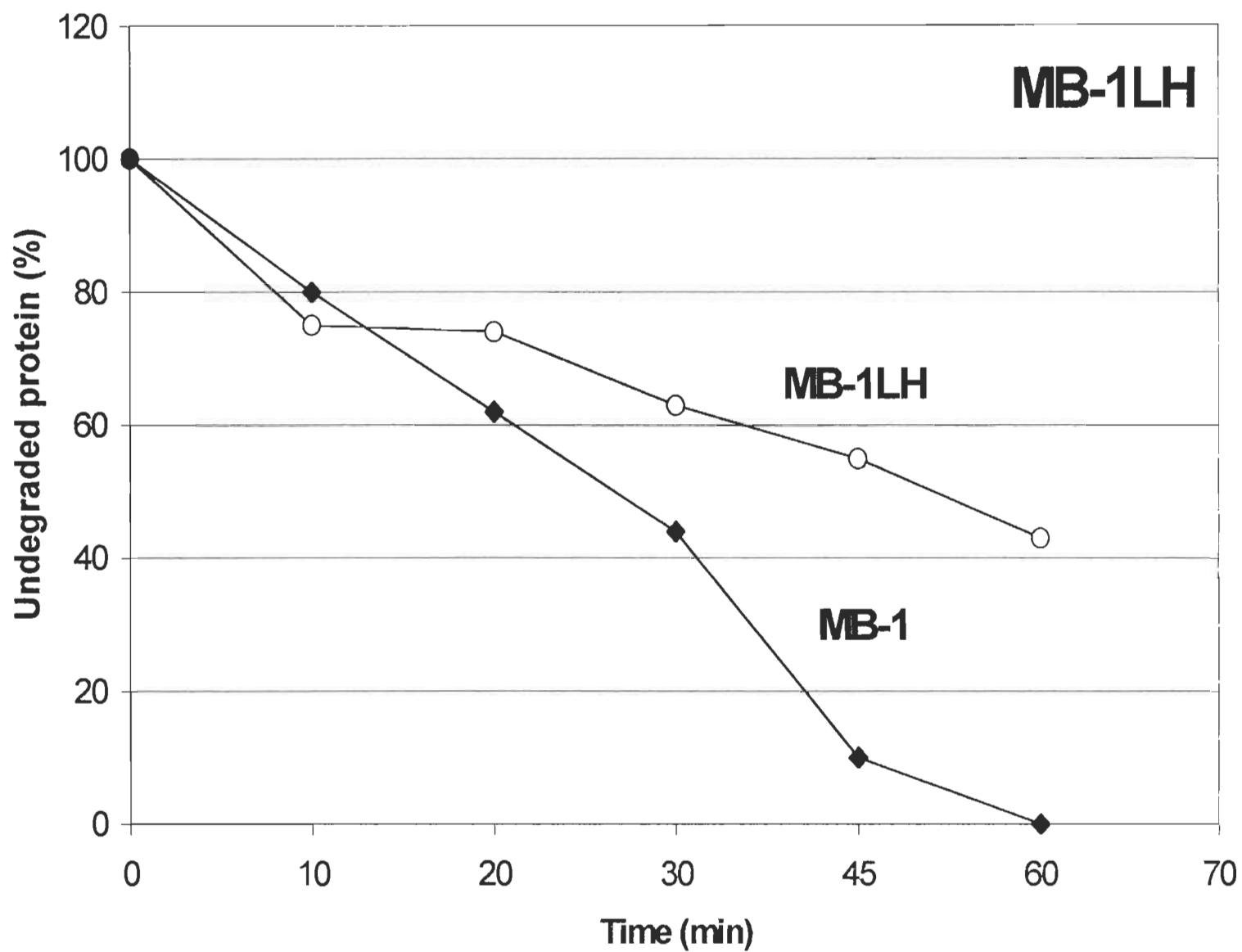
Figure 2.5

Figure 2.6



Chapitre 3

Conclusion

3.1. Pourquoi stabiliser MB-1?

MB-1 est une protéine *de novo* contenant un pourcentage élevé (57%) en acides aminés essentiels (M,T,K et L). Ces AAEs ont été choisis puisqu'ils sont connus pour être limitants à une production optimale de lait et de protéines de lait chez les ruminants, particulièrement chez les vaches en lactation active (Orskov *et al*, 1987; Chalupa, 1975; Stern *et al*, 1985; Ashes *et al*, 1995). En plus de son taux élevé en AAEs, MB-1 contient plusieurs caractéristiques similaires aux protéines natives. Cependant, contrairement à la majorité des autres protéines *de novo*, qui sont produites par synthèse chimique, MB-1 est exprimée *in vivo* (E.coli) et peut être récupérée même après la dégradation protéolytique possible provenant de l'hôte qui l'a produit. La récupération de MB-1 après son expression nous indique que non seulement que la protéine se plie intracellulairement, mais que MB-1 est un candidat viable pour être exprimé dans d'autres organismes vivants tels que les plantes transgéniques et les microbes du rumen.

Peu importe quel organisme est choisi pour son expression, MB-1 va être exposé à certains risques de dégradation protéolytique. La protéine normale MB-1 n'est présentement pas assez résistante dans des conditions ruminales (MacCallum *et al*, 1997) pour être un candidat nutritionnel intéressant permettant de procurer aux ruminants une quantité suffisante d'AAEs. De plus, des essais pour déterminer la structure tertiaire de MB-1 par diffraction à rayons X ont échouées principalement à cause de l'impossibilité d'obtenir des cristaux d'une qualité satisfaisante (Grundy *et al*, 1998). Afin d'améliorer nos chances de réussir un tel projet, il faut tout d'abord augmenter la stabilité de la protéine MB-1.

3.2. Comment stabiliser MB-1?

Pour rendre la protéine plus intéressante au niveau de son application biotechnologique et pour réussir à la cristalliser, il faut premièrement augmenter la stabilité conformationnelle et protéolytique de notre protéine. C'est cela qui nous a poussé à incorporer un élément connu pour augmenter la stabilité de la majorité des protéines. Plusieurs éléments peuvent être utilisés pour arriver à augmenter la stabilité, cependant peu de ces éléments réussissent à stabiliser une protéine comme le fait le lien covalent d'un pont disulfure. Pour cette raison et plusieurs autres déjà mentionnées, on a introduit un pont disulfure à une position stratégique dans MB-1. Cependant, les positions ont été choisies selon le modèle d'un carré à 4 hélices et non pas selon une structure tridimensionnelle résolue par diffraction à rayons X. Cela peut causer de nombreux problèmes si le modèle ne représente pas la structure réelle de la protéine d'intérêt.

3.3. Caractérisation de MB-1LH

En choisissant les positions « d » du modèle de l'heptade, qui sont les positions favorisées pour la formation du pont (Zhou *et al*, 1993), il nous a été possible d'introduire un pont disulfure entre l'hélice 1 et l'hélice 4 du noeud d'hélices. Après avoir purifié et caractérisé la protéine mutante (MB-1LH) avec diverses techniques, nous avons déterminé l'effet du pont disulfure sur certaines caractéristiques de la protéine normale MB-1.

1) La protéine migre sous forme d'une seule bande et n'a pas de bande de dégradation à 8.4 kDa comme on le voit lors de la purification de la protéine normale. Ce

résultat démontre que le pont disulfure permet à la protéine de cacher certains sites protéolytiques normalement présents chez la protéine normale (Hefford et Beauregard, non-publié). Cette interprétation est aussi appuyée par le fait que MB-1LH élue sous forme de monomère et que la protéine normale MB-1 élue sous forme de dimère par chromatographie d'exclusion de taille (Hefford *et al*, 1999). En ajoutant le pont disulfure, cela a possiblement rapproché les hélices du carré d'hélices, ce qui permet peut-être d'influencer les forces électrostatiques impliquées dans la dimérisation de MB-1 et donc de spécifier une conformation monomérique chez la protéine mutante. 2) Des mesures prises par dichroïsme circulaire (fig. 2.2) indiquent que MB-1LH contient un pourcentage de structures hélicoïdales (59%) similaires à celui observé chez MB-1 (Beauregard *et al*, 1995). Cela nous indique qu'avec le pont intact, la protéine garde ses structures secondaires hélicoïdales. 3) À l'aide d'expériences de dénaturation thermique (mesuré par CD) de la protéine, il fut déterminé que MB-1LH avait un T_m de 43°C (fig. 2.5), soit 4°C plus élevé que la protéine MB-1 (MacCallum *et al*, 1997). De plus, en renaturant la protéine, la protéine mutante a récupéré 90% de ses hélices, tandis que la totalité de ses structures hélicoïdales furent récupérée après 16 h d'incubation à la température de la pièce. Cette renaturation totale de la protéine est une caractéristique qui n'a jamais été observée chez MB-1. L'augmentation du T_m est aussi très intéressante puisque dans des conditions ruminales, la température est de 39°C. D'après le T_m mesuré de MB-1 (39°C), cela indique que la protéine normale est déjà dénaturée à 50% à cette température. La protéine mutante MB-1LH devrait donc être plus résistante dans ces mêmes conditions puisqu'elle devrait être majoritairement pliée à 39°C. 4) En faisant les tests de dégradation, il fut déterminé que MB-1LH résistait 2 fois plus longtemps à la

dégradation protéolytique dans les mêmes conditions utilisées pour MB-1 (fig. 2.6) (Morrison *et al.*, en presse). Le pont disulfure nous a donc permis d'augmenter la stabilité thermique, ce qui augmenté simultanément la stabilité protéolytique.

Ces résultats démontrent bel et bien que le pont disulfure a réussi à stabiliser la protéine de plusieurs façons. Cependant, même si certaines caractéristiques majeures ont été améliorées par rapport à la protéine normale, on peut noter certaines caractéristiques qui ont été influencées de façon négative. Parmi ceux-ci, on peut noter une augmentation de l'exposition de la tyrosine (fig. 2.3) (lorsque la protéine « respire ») puisque qu'on observe un plus grand quenching de fluorescence. On observe aussi une augmentation de la fluidité du noyau hydrophobe comparativement à MB-1 (Morrison *et al.*, en presse), par un rendement quantique de fluorescence plus élevé en présence du fluorophore extrinsèque (ANSA) (fig. 2.4). Une explication pour cette augmentation de fluidité est que les acides aminés remplacés, leucine et méthionine, sont d'une taille plus grande que les cystéines permettant la formation du pont disulfure. L'introduction des cystéines dans ces positions a possiblement déstabilisé la formation du noyau hydrophobe et laissé un trou permettant l'entrée des fluorophores. D'autre part, les cystéines sont plus polaires que les résidus remplacés, ce qui représente une source additionnelle de la déstabilisation. Cette hypothèse est supportée par l'effet de la réduction du pont qui a mené à la dénaturation presque complète de la protéine MB-1LH. Ce résultat nous indique à quel point les mutations déstabilisent la protéine. Cependant, même avec cette déstabilisation énorme, le pont disulfure réussit à compenser pour la déstabilisation due aux mutations. Si les mutations n'étaient pas déstabilisantes, il serait très intéressant de voir à quel point le pont disulfure stabilise la protéine. Cette différence peut être très importante *in vivo*

puisque, dépendant de l'environnement, la protéine pourrait être soit très stable (pont intact) ou soit totalement dénaturée (pont brisé), ce qui la rendrait très sensible à la dégradation protéolytique dans les hôtes qui l'expriment. La stratégie utilisée pour localiser les cystéines était basée sur une supposition très importante : que MB-1 était plié en carré d'hélices. Or, le fait que le pont se forme facilement, qu'avec ce pont, la protéine se comporte comme si elle était pliée en carré d'hélices (CD, fluorescence), indique que MB-1 se plie probablement en carré d'hélices ou dans une conformation semblable.

3.4. Méthodes d'expressions envisagées

Cependant, avant que MB-1 ou un de ses mutants puissent être utilisés comme supplément en nutrition animal, il faut trouver un moyen facile pour produire et acheminer la protéine aux animaux. Pour ce faire, il y a 2 techniques qui sont présentement en plein développement pour MB-1 et ses dérivés. La première technique consiste à produire la protéine dans une bactérie nichant naturellement dans le rumen. (Teather *et al*, Ruminant production system for MB-1 derivatives, patent pending). De cette manière, la protéine serait produite intracellulairement et serait accessible à l'animal lors de la lyse de la bactérie dans l'abomasum. Pour qu'une telle méthode fonctionne, il faudrait que la protéine soit résistante aux protéases intracellulaires de la bactérie d'intérêt. Une approche comme celle-ci donnerait de la protection à la protéine contre la dégradation protéolytique dans le rumen et serait un moyen de minimiser les coûts de production. La deuxième approche consiste à produire une plante transgénique (luzerne, soya, etc) contenant le gène de la protéine MB-1 ou d'un de ses dérivés. De cette manière,

le producteur pourrait facilement produire la plante transgénique, enrichie en supplément MB-1, et fournir les AAEs pour optimiser la production de lait et des protéines du lait. En choisissant stratégiquement la région de la plante où la protéine va être exprimée, la protéine pourra sous-traiter au rumen avec un minimum de dégradation et ne sera pas surprotégée de la dégradation dans l'abomasum et dans l'intestin. Ces deux approches sont en train d'être mises au point par différents collaborateurs de recherche et seront des méthodes très intéressantes dans le domaine de la nutrition animale pour fournir les AAEs en plus de diminuer les coûts de production (Dyer *et al*, 1993; Ealing *et al*, 1994; Williamson, 1996). L'autre intérêt du projet est la détermination de la structure 3D de MB-1 ou d'un de ses mutants. Avec la structure tridimensionnelle, le choix de nouvelles mutations pour améliorer la structure serait beaucoup plus facile et l'élucidation de nouveaux principes de design deviendrait possible.

3.5. Suggestions pour améliorer la stabilité conformationnelle et protéolytique de MB-1 et ses dérivés.

Avec les résultats obtenus pour MB-1LH, plusieurs éléments pourraient être modifiés pour s'assurer que la protéine possède une conformation stable ainsi qu'un comportement natif similaire aux protéines naturelles. La première suggestion serait de faire des essais de cristallisation sur le nouveau mutant. L'obtention d'un cristal d'une qualité adéquate pour faire des expériences de diffraction par rayons X nous donnerait l'information nécessaire pour améliorer énormément la stabilité conformationnelle et protéolytique de la protéine *de novo*. Une autre suggestion pour tenter d'améliorer la structure tertiaire de MB-1LH serait d'essayer de réévaluer le design du noyau

hydrophobe avec la présence des résidus cystéines qui forment le pont disulfure. En regardant l'effet des chaînes latérales plus petites des cystéines comparativement à la leucine et la méthionine qui ont été remplacés, on pourrait probablement tenter de remplir le trou en remplaçant d'autres résidus plus petits, impliqués dans la formation du noyau hydrophobe, par des acides aminés ayant une chaîne latérale plus grosse. Ce remplacement permettrait peut-être de remplir le trou hydrophobique causé par les mutations cystéines et d'augmenter encore plus la stabilité conformationnelle de la protéine. D'autre part, il ne faut pas oublier l'impact de la complémentarité spatiale des chaînes latérales du noyau sur la stabilité d'une protéine globulaire. Il est bien connu que la meilleure complémentarité entre les positions « a » et « d » pour un carré d'hélices est une complémentarité leucine-alanine. Dans notre cas, il ne faut surtout pas oublier l'application biotechnologique du projet qui consiste à incorporer le plus d'AAEs possibles dans la structure, ce qui nous empêche d'utiliser un grand nombre de ces complémentarités favorisées. Cependant, l'identification et l'essai de différentes combinaisons pour la formation d'un noyau compact et structuré, tout en essayant de garder le plus de ces AAEs possibles, sera certainement plus facile si on peut obtenir un aperçu de la structure tertiaire de la protéine.

Références

- Ashes, J.R., Gulati, S.K. and Scott, T.W. (1995) The role of rumen protected proteins and energy sources in the diet of ruminants. In : Ivan, M., ed. *Animal Science Research and Development : Moving Towards a New Century*. CFAR contribution no. 2321. Ottawa, ON : ministry of supplies and Services Canada (ISBN 0-662-23589-4), 177-185.
- Beauregard, M., Dupont, C., Teather, R.M. and Hefford, M.A. (1995) *Bio/Technology*, 13, 974-981.
- Betz, S.F. and Degrado, W.F. (1996) *Biochemistry*, 35, 6955-6962.
- Bryson, J.W., Betz, S.F., Lu, H.S., Suich, D.J., Zhou, H.X., O'Neil, K.T. and Degrado, W.F. (1995) *Science*, 270, 935-941.
- Chalupa, W. (1975) *J. Dairy Science*, 58, 1198-1218.
- Church, D.C. (1988) *The Ruminant Animal : Digestive Physiology and Nutrition*. Reston : Prentice Hall.
- Cohen, C. and Parry, D.A.D. (1990) *Prot. Struc. Func. Gen.*, 7, 1-15.
- Creighton, T.E. (1989) *Protein Structure : a Practical Approach*. Oxford : IRL Press.
- Delumen, B.O., Krenz, D.C. and Revilla, J. (1997) *Food Technol.*, 51, 67-70.
- Dill, K.A. (1990) *Biochemistry*, 29, 7133-7155.
- Dyer, J.M., Nelson, J.W. and Murai, N. (1993) *J. Protein Chem.*, 12, 545-560.
- Ealing, P.M., Hancock, K.R. and White, D.W. (1994) *Transgenic Res.*, 3, 344-534.
- Grundy, J., Morrison, J.J., MacCallum, J.D., Wirtanen, L. and Beauregard, M. (1998) *J. Biotechnol.*, 63, 9-15.
- Hancock, K.R., Ealing, P.M. and White, D.W.R. (1994) *Brit. J. Nutr.*, 72, 855-863.
- Hefford, M.A., Dupont, C., MacCallum, J., Parker, M.H. and Beauregard, M. (1999) *Eur. J. Biochem.*, 262, 467-474.
- Hoffman, L.M., Donaldson, D.D. and Herman, E.M. (1988) *Plant Mol. Biol.*, 11, 717-729.

Hutgens, M.F., Overton, T.R. and Brand, A. Monitoring Milk Production : Optimizing Rumen Digestion in the Dairy Cow. Ch. 4, part 1. In : Brand, A., Noorrdhuizen, J.P.T.M. and Schukken, Y.H., eds. Herd Health and Production Management in Dairy Practice. The Netherlands : Wageningen Pers., 1996.

Jaynes, J.M., Langridge, P., Anderson, K., Bond, C., Snads, D., Newman, C.W. and Newman, R. (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 200-205.

Klink, T.A., Woycechowsky, K.J., Taylor, K.M. and Raines, R.T. (2000) *Eur. J. Biochem.*, 267, 566-572.

Lawrence, M.C., Suzuki, E., Varghese, J.N., Davis, P.C., Van Dontelaar, A., Tulloch, P.A. and Colman, P.N. (1990) *EMBO J.*, 9, 9-15.

MacCallum, J.D., Hefford, M.A., Omar, S. and Beauregard, M. (1997) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 66, 83-93.

Mahadevan, S., Erfle, J.D. and Sauer, F.D. (1980) *Anim. Sci.*, 50, 723-728.

Matsumura, M., Bechtel, W.J., Levitt, M. and Matthews, B.W. (1989a) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 6562-6566.

Matsumura, M., Signor, G. and Matthews, B.W. (1989b) *Nature*, 342, 291-193.

McNabb, W.C., Spencer, D. and Higgins, T.J. (1994) *J. Sci. Food Agric.*, 64, 53-59.

McNiven, M.A., Robinson, P.H. and Macleod, J.A. (1994) *J. Dairy Sci.*, 77, 2605-2613.

Miller, W.J. (1979) *Dairy Cattle Feeding and Nutrition*. Orlando, Florida : Academic Press.

Morrison, J.J., McNally, D., Navidzadeh, A. and Beauregard, M. *Appl. Biochem. Biotech.* in press.

Orskov, E.R., Reid, G.W. and Tair, C.A.G. (1987) *Anim. Prod.*, 45, 345-348.

Privalov, P.L. (1979) *Adv. Prot. Chem.*, 33, 167-241.

Purser, D.B. (1970) *J. Anim. Sci.*, 30, 988-1001.

Spencer, D., Higgins, T.J.V., Freer, M., Dove, H. and Coombe, J.B. (1988) *Brit. J. Nutr.*, 60, 241-247.

Stern, M.D., Santos, K.A. and Sattler, L.D. (1985) *J. Dairy Sci.*, 68, 45-56.

Tamminga, S. (1979) *J. Anim. Sci.*, 49, 1615-1630.

Tanner, G.J., Moore, A.E. and Larkin, P.J. (1994) *Brit. J. Nutr.*, 71, 947-958.

Williamson, M. (1996) *Trends Biotech.*, 14, 449-450.

Wrede, P. and Schneider, G. (eds). (1994) *Concepts in Protein Engineering and Design*. Berlin : Walter de Gruyter & Co.

Zhou, N.E., Kay, C.M. and Hodges, R.S. (1993) *Biochemistry*, 32, 3178-3187.